

Titre: Étude de l'effet de la sous-expression de l'enzyme triosephosphate isomérase cytosolique sur le métabolisme de cellules de pomme de terre à l'aide d'un modèle métabolique cinétique
Title:

Auteur: Alexandre Valancin
Author:

Date: 2012

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Valancin, A. (2012). Étude de l'effet de la sous-expression de l'enzyme triosephosphate isomérase cytosolique sur le métabolisme de cellules de pomme de terre à l'aide d'un modèle métabolique cinétique [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/887/>
Citation:

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/887/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Mario Jolicoeur, Jean Rivoal, & Balasubrahmanyam Srinivasan
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDE DE L'EFFET DE LA SOUS-EXPRESSION DE L'ENZYME
TRIOSEPHOSPHATE ISOMÉRASE CYTOSOLIQUE SUR LE MÉTABOLISME
DE CELLULES DE POMME DE TERRE À L'AIDE D'UN MODÈLE
MÉTABOLIQUE CINÉTIQUE

ALEXANDRE VALANCIN

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)

JUIN 2012

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

ÉTUDE DE L'EFFET DE LA SOUS-EXPRESSION DE L'ENZYME
TRIOSEPHOSPHATE ISOMÉRASE CYTOSOLIQUE SUR LE MÉTABOLISME
DE CELLULES DE POMME DE TERRE À L'AIDE D'UN MODÈLE
MÉTABOLIQUE CINÉTIQUE

présenté par : VALANCIN Alexandre

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. FRADETTE Louis, Ph. D., président

M. JOLICOEUR Mario, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. SRINIVASAN Bala, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. RIVOAL Jean, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. PERRIER Michel, Ph. D., membre

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier avant tout mon directeur, le Pr. Mario Jolicoeur de m'avoir transmis le goût de la culture cellulaire et des procédés biotechnologiques. Merci à lui également de m'avoir fourni les moyens de faire un pas en recherche dans le domaine. Merci à mon codirecteur, le Pr. Jean Rivoal pour ses conseils attentifs sur les cultures végétales. Merci aussi à mon autre codirecteur le Pr. Bala Srinivasan pour ses conseils et son talent à présenter les mathématiques avec simplicité.

Merci à Jingkui Chen pour les analyses chimiques. J'aimerais saluer également mes collègues de l'Institut en Recherche en Biologie Végétale. Un grand merci à Sonia Dorion de l'IRBV, pour sa bonne humeur quotidienne, et pour m'avoir si bien encadré et apporté les réponses à mes nombreuses questions pendant mon passage à l'institut.

À mes collègues également de Polytechnique, Cyril, Cédric, Nesrine, Loïc, Ines, Atefeh, Zahra, July pour nos échanges scientifiques, nos fous rires, nos sorties et nos « craquages » au bureau. Un merci tout particulier à Claudia que j'ai découverte grâce à la maîtrise, pour son oreille attentive et sa bonne humeur communicative.

Merci à mes amis Alicia, Jean-Yves, Arno, Mathilde, François, Viêt, Amélie, David, Ezster, les « phénoménaux », et les autres de l'ECM pour ces bons moments passés avec vous. Je vous dis à bientôt au Québec ou ailleurs. Un merci particulier à Nicolas pour son hospitalité, et m'avoir supporté en cette fin de mémoire ! Merci à Déborah pour ses encouragements par lettre. Un merci particulier à Damien et sa famille pour les encouragements et le soutien infaillible même dans les moments plus difficiles. Merci aux amis belges, je reviens dans pas longtemps, une fois ! Merci à Gaëlle pour ses encouragements même loin, on se supporte mutuellement.

Je remercie ma mère Patricia pour m'avoir toujours répété combien elle croyait en moi. Merci à mon frère, Rémi pour m'avoir rappelé combien la famille était importante.

Merci à l'École Centrale Marseille de m'avoir offert l'opportunité de découvrir une nouvelle culture et poursuivre mes études dans un nouvel environnement stimulant. Un merci particulier aux personnes là-bas, qui ont pu m'aider à réaliser ce projet en particulier les Relations Internationales à travers Emmy Arts et Marianne Gonssard. J'aimerais aussi exprimer ma

reconnaissance envers l'État Français et le Canada pour les aides financières que j'ai pu recevoir sans lesquelles, cette aventure aurait été beaucoup plus difficile.

Enfin, merci aux professeurs Louis Fradette et Michel Perrier et mes directeurs, d'avoir accepté de juger ce travail de maîtrise.

RÉSUMÉ

Le métabolisme végétal est complexe et démontre une grande flexibilité face à des changements environnementaux tels que des variations de température, ou encore un manque de nutriments ou même d'eau. Aussi, même si les grandes voies et acteurs du réseau métabolique sont désormais bien décrits, il est encore très difficile de prédire les effets que peuvent avoir des changements dans une voie métabolique précise sur l'ensemble du système biologique. La régulation métabolique n'étant que partiellement décrite à ce jour. En particulier, le rôle de la triosephosphate isomérase (cTPI) cytosolique, une enzyme responsable d'une réaction située au milieu de la glycolyse, à la jonction avec la synthèse des triglycérides et la voie des pentoses phosphate, demande à être éclairci. Pour cette raison, deux clones de racines chevelues de *Solanum tuberosum* ont été étudiés dans ce projet, l'un servant de contrôle, l'autre, transgénique, présentant un niveau d'expression en TPI cytosolique diminué de 90% via de l'ARN antisens.

Deux cultures de 7 jours en flacons agités ont été réalisées avec les clones "contrôle" et "cTPI antisens". Des mesures quotidiennes des concentrations extracellulaires en nutriments, ainsi qu'intracellulaires en sucres phosphatés et acides organiques ont été réalisées. Un modèle métabolique cinétique, calibré sur les données recueillies et basé sur des travaux antérieurs de l'équipe de recherche, a été développé. Le modèle comprend 31 réactions décrivant les voies métaboliques importantes telles que la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, le cycle de Krebs, et certaines réactions anaboliques pour un total de 40 métabolites considérés.

Il a été observé que certaines concentrations métaboliques (nutriments, partie basse de la glycolyse et à l'intérieur du cycle TCA) étaient significativement modifiées dans le clone à faible expression en cTPI, et donc que le métabolisme avait bien été affecté. Les simulations effectuées par utilisation du modèle ont également révélé que certains flux métaboliques différaient entre le contrôle et l'antisens cTPI. En particulier, les échanges entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphates sont intensifiés alors que certains taux de réactions dans la partie basse de la glycolyse et dans le cycle TCA sont diminués. Finalement, ces travaux de maîtrise apportent un nouvel éclairage sur le rôle de la cTPI dans le métabolisme végétal, et sur l'intérêt d'utiliser un modèle mathématique dans des travaux de compréhension dudit métabolisme.

ABSTRACT

Plant cell metabolism is complex and shows a strong flexibility towards environmental modifications as temperature shift, water stress, or lack of nutrients. Even if the main pathways and intermediates of metabolism are well described, predicting the effect of certain changes on the metabolism remains a difficult task because of the lack of knowledge on metabolic regulation. Cytosolic triosephosphate isomerase (cTPI) is the enzyme in charge of a reaction located in the middle of the glycolysis, at the junction with the pentose phosphate pathway and the triglycerides synthesis. In order to better understand its role within plant metabolism, two hairy roots clones were studied: one as a control and the other one, transgenic, with cytosolic TPI expression level decrease by 90% via a RNA-antisense.

Two 7-days batch cultures in shake flasks were performed for the comparison of these two clones “control” and “cTPI antisense”. Measurements of major extracellular nutrients, and intracellular sugars phosphates, and organic acids were performed on samples taken daily. We used these data to develop a kinetic-metabolic model based on previous works in the group. The model includes 31 reactions describing important pathways of primary metabolism such as glycolysis, pentose phosphate pathway (PPP), TCA cycle as well as some anabolic reactions for a total of 40 metabolites taken into account.

We observed that specific nutrients concentrations as well as intracellular metabolites were significantly modified, primarily in the, the down-part of the glycolysis and the TCA cycle, meaning that the decrease in cTPI affected the metabolism. The use of the kinetic-metabolic model also revealed that certain metabolic fluxes were also modified. Exchanges between glycolysis and the PPP were increased whereas the down-part of the glycolysis and some TCA cycle reactions were lowered in the cTPI antisense clone. Finally, this work gives a new insight on the role of cTPI in plant cell metabolism and how a mathematical model can help in metabolism understanding.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIII
LISTE DES ANNEXES.....	XV
INTRODUCTION.....	1
Objectif.....	3
Méthodologie	3
Chapitre 1 REVUE DE LITTÉRATURE	5
1.1 Physiologie et métabolisme des cellules végétales	5
1.1.1 Physiologie des cellules végétales.....	5
1.1.2 Gestion des nutriments	6
1.1.3 Voies du métabolisme primaire.....	9
1.2 Caractérisation métabolique des cellules végétales	21
1.2.1 Génie et modélisation métaboliques	21
1.2.2 Mesures métaboliques	25
1.3 Le modèle biologique des racines chevelues (« hairy roots »)	34
1.3.1 Établissement des cultures de racines chevelues.....	34
1.3.2 Intérêts biologique et commercial	34
1.3.3 Survol de l'exploitation industrielle.....	36

Chapitre 2	ANALYZING THE EFFECT OF DECREASING CYTOSOLIC TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE ON SOLANUM TUBEROSUM HAIRY ROOTS CELLS USING A KINETIC-METABOLIC MODEL	41
2.1	Résumé	41
2.2	Authors	41
2.3	Keywords	42
2.4	Running title	42
2.5	Abstract	42
2.6	Introduction	43
2.7	Materials and Methods	44
2.7.1	Plant material and hairy root cultures	44
2.7.2	Metabolites analysis	45
2.7.3	Kinetic modeling	47
2.7.4	Parameter identification	53
2.8	Results and Discussion	56
2.8.1	The decrease of cTPI affects primary metabolism intermediates concentrations	56
2.8.2	Effect of a decrease in cTPI on metabolism dynamics as revealed from <i>in silico</i> model simulations	59
2.8.3	The cTPI : an enzyme located at a key branch point for metabolic engineering	64
2.9	Conclusions	65
2.10	Acknowledgements	66
2.11	References	66
2.12	List of abbreviations	71
Chapitre 3	DISCUSSION GÉNÉRALE	73
3.1	Effet de la diminution du niveau d'expression de la cTPI	73

3.2	Limites de l'étude.....	75
3.2.1	Hypothèses de modélisation.....	75
3.2.2	Système biologique utilisé	77
3.2.3	Validation du modèle	78
CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS		79
BIBLIOGRAPHIE		83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Types de réactions impliquées dans le métabolisme.....	10
Tableau 1.2 : Résumé des méthodes d'extraction et analyses des métabolites	33
Tableau 1.3 : Métabolites produits par des racines chevelues et applications	36
Tableau 1.4 : Comparatif de réacteurs pour la culture de racines	38
Tableau 2.1 : Molecular weights of macromolecules	49
Tableau 2.2 : Reactions considered in the kinetic model.....	51
Tableau 2.3: Kinetics rates expressions	52
Tableau 2.4 : Initial conditions for the non-measured metabolites	54
Tableau 2.6 : Vmax estimated in $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{FW}$ (with 95 % confidence intervals). Assumed values of K_m (in $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (for R1 to R7) then $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{FW}$) are also given.....	55
Tableau 2.5 : Oxygen specific uptake rate q_{O_2} in $\mu\text{mol gFW}^{-1}\text{d}^{-1}$ ($n = 5$). Values are given with 95% confidence intervals	57

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Représentation schématique d'une cellule végétale (Buchanan, Buchanan, & Gruissem, 2009)	5
Figure 1.2 : Lyse du saccharose par les enzymes invertase et saccharose synthase	7
Figure 1.3 : Voie de synthèse de l'amidon	7
Figure 1.4 : Représentation de la glycolyse	11
Figure 1.5 : Réaction d'isomérisation des trioses phosphates, catalysée par la TPI.....	12
Figure 1.6 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la TPI.....	13
Figure 1.7 : Représentation de la voie des pentoses phosphates et liens avec la glycolyse.....	14
Figure 1.8 : Représentation du cycle de Krebs.....	16
Figure 1.9 : Oxydation phosphorylante chez les cellules végétales (Buchanan et al., 2009)	17
Figure 1.10 : Cycle GS/GOGAT (Buchanan et al., 2009)	19
Figure 1.11 : Réaction de transamination.....	20
Figure 1.12 : Représentation des voies de synthèse des famille d'acides aminés (Buchanan et al., 2009).....	21
Figure 1.13 : Différentes approches en modélisation métabolique (Ralf, 2007)	22
Figure 1.14 : Étapes composant une mesure du métabolisme idéale	26
Figure 1.15 : Échelle des seuils de détection de différentes techniques d'analyse chimique.....	29
Figure 1.16 : Utilisation GC ou LC pour des mesures métaboliques.....	31
Figure 1.17 : Représentation schématique d'un réacteur complètement agité	39
Figure 1.18 : Représentation schématique d'un réacteur à bullage (airlift).....	39
Figure 1.19 : Représentation schématique d'un réacteur cylindre rotatif.....	39
Figure 1.20 : Représentation schématique d'un réacteur à bruine.....	39
Figure 2.1: Metabolic network. Reaction numbers are in brackets. Orange arrows represent nutrients uptake. See Table 2 for reactions details.....	50

Figure 2.2 : Simulation and experimental data for (a) biomass (gFW) and medium volume (n = 10) (L), (b) extracellular nutrients ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) (n = 3) and (c) intracellular nutrient ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ FW) (n = 3). Control in black, cTPI antisense in grey. Error bars represent	58
Figure 2.3 : Simulation and experimental data (in $\mu\text{mol.g}^{-1}$ FW) with glycolysis intermediates (G6P, F6P, PYR, T3P), PPP intermediates (R5P, E4P), TCA cycle intermediates (aKG, SUCC, FUM, MAL, OXA, ACOA) and cell building blocks (LIP, AA, STA, NUC, STH). Control in black, cTPI antisense in grey. Error bars represent the 95% confidence intervals of 5 independent samples.	62
Figure 2.4 : Kinetic rates $r(t)$ in $\mu\text{mol.g}^{-1}$ FW.d ⁻¹ obtained via the simulations. Control in black, cTPI antisense in grey.	63
Figure 3.1 : Représentation schématique de l'effet de la diminution de la cTPI sur le métabolisme végétal	75
Figure 3.2 : Représentation schématique de la transformation mathématique des avancements de réaction	81

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AA	Acides aminés
ACOA	Acetyl Coenzyme A
ADP	Adénosine diphosphate
AKG	Alpha-cétoglutarate
AMP	Adénosine monophosphate
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
CO ₂	Dioxyde de carbone
E_X	Concentration en X Extracellulaire
PYR	Pyruvate
E4P	Erythrose-4-phosphate
F6P	Fructose-6-Phosphate
FRU	Fructose
FUM	Fumarate
G1P	Glucose-1-Phosphate
G6P	Glucose-6-Phosphate
GLC	Glucose
MAL	Malate
NAD(H)	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADP(H)	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NH ₄	Ammonium
NO ₃	Nitrate

NUC	Acides nucléiques
O ₂	Dioxygène
OXA	Oxaloacétate
Pi	Phosphate inorganique (H ₂ PO ₄)
PPi	Pyrophosphate
PYR	Pyruvate
R5P	Ribose-5-Phosphate
SUC	Saccharose
SUCC	Succinate
T3P	Trioses-3-phosphate
UDP	Uridinediphosphate

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Matrice de stœchiométrie	97
ANNEXE 2 : Fichiers Matlab	98

INTRODUCTION

« Ayez le culte de l'esprit critique. »

Louis Pasteur (1822-1895)

Le métabolisme (de « μεταβολή » en grec pour « transformation, changement ») est cet ensemble de mécanismes biochimiques intégrés qui sous-tendent la vie cellulaire. Par vie cellulaire, on entend tous les phénomènes inhérents à la survie de cellules, allant de leur croissance, leur communication, leur défense et ultimement leur mort. On distingue au sein du métabolisme, d'une part le catabolisme visant la dégradation de molécules en précurseurs divers alimentant les voies d'anabolisme (ici-bas) ainsi que pour la production d'énergie et, d'autre part l'anabolisme chargé de la synthèse de macromolécules telles que les lipides, les acides nucléiques, l'ARN et l'ADN de même que les protéines. Au cours des dernières décennies, les progrès en biochimie ont permis d'atteindre un niveau de description de plus en plus fin quant au rôle de chacun des acteurs du métabolisme. Entre autre, le rôle fondamental des enzymes sur les mécanismes métaboliques a été particulièrement étudié par la communauté. Pour autant, les liens intimes s'exerçant entre molécules et réactions (i.e. régulation) composant le métabolisme sont encore flous voire totalement inconnus. Dès lors se pose la question de comment mieux approcher notre étude du métabolisme.

En particulier, la compréhension et ultimement le contrôle du métabolisme végétal pourrait ouvrir la voie à de nombreuses innovations biotechnologiques pour des applications tant au niveau agro-alimentaires, que pharmaceutiques et environnementales. Actuellement, les procédés de production biopharmaceutique sont basés en majeure partie sur des bactéries, des cellules d'insectes ou de mammifères (Walsh, 2010). Cependant ces derniers demeurent relativement coûteux et sensibles à la contamination par des pathogènes tels virus et prions. Or, un des avantages de la plateforme de production basée sur des cellules végétales réside en des coûts en milieu de culture faibles par rapport aux cellules de mammifère, ainsi qu'au fait que ces cellules ne promeuvent pas le développement de pathogènes pour l'humain (Daniell, Streatfield, & Wycoff, 2001). Cependant, les rendements de production via les cellules végétales sont souvent insatisfaisants, ce qui explique la frilosité des industries biotechnologiques à leur utilisation.

C'est pourquoi de nombreux laboratoires de recherche s'attellent à l'étude et à l'amélioration de lignées végétales plus productives. Pour cela, une énergie certaine est déployée à la compréhension du métabolisme d'une part et à l'optimisation des procédés de production d'autre part (Daniell et al., 2001; Hellwig, Drossard, Twyman, & Fischer, 2004; Kirakosyan, Leland, & Kaufman, 2009). En particulier, compte tenu de leur croissance rapide, de leur caractère différencié et de leur stabilité génétique, les racines dites « chevelues » ("hairy roots") constituent un système biologique de choix d'une part pour l'étude du métabolisme végétal et d'autre part pour la production de métabolites spécifiques à usage thérapeutique, entre autres (Shanks & Morgan, 1999).

Le génie métabolique se voue à décrire les phénomènes biochimiques opérés au sein de la cellule. En particulier, les végétaux présentant une flexibilité particulière de leur métabolisme primaire en réponses à des stress environnementaux (López-Bucio, Nieto-Jacobo, Ramirez-Rodriguez, & Herrera-Estrella, 2000), il est nécessaire de bien comprendre ces mécanismes intracellulaires.

Aussi des modèles métaboliques de cellules végétales ont été développés à la Chaire de recherche du Canada en génie métabolique appliqué et ont démontré leur intérêt dans des études de compréhension du comportement cellulaire. Par exemple (L. Lamboursain & Jolicoeur, 2005) ont identifié les des nutriments déterminants sur le comportement cellulaire. De même, les modèles ont démontré être en mesure d'être utilisés pour le contrôle de la concentration en nutriments intracellulaires (Pi mais aussi GLC) (Mathieu Cloutier, Chen, De Dobbeleer, Perrier, & Jolicoeur, 2009; M. Cloutier et al., 2009). Même si un modèle ne peut décrire un réseau métabolique en entier, il offre une plateforme utile à l'étude et à la compréhension du métabolisme, et son contrôle en bioprocédés. En particulier, cette dernière approche visant le contrôle du métabolisme s'inscrit directement dans la logique des « Process Analytical Technology » (PAT) promue par la Food and Drug Administration (FDA) en 2004 (Gnoth, Jenzsch, Simutis, & Lübbert, 2007; Munson, Stanfield, & Gujral, 2006). La FDA œuvre, avec le PAT, à un meilleur contrôle des procédés de production pharmaceutiques, et à une homogénéité dans la qualité des produits délivrés, en développant par exemple des outils de mesures en ligne (biomasse, état nutritionnel etc.).

Ces travaux de maîtrise s'inscrivent d'abord dans un objectif de compréhension du métabolisme végétal non photosynthétique, *in vitro*. L'objet ici est de préciser le rôle de la cTPI et se fera via

l'utilisation de racines chevelues de pomme de terre (*Solanum tuberosum*). En effet, la cTPI catalyse une réaction de la glycolyse qui est rarement mise de l'avant alors qu'elle est un point de jonction important entre plusieurs voies, à savoir la voie des pentoses phosphates, la voie des lipides et la glycolyse. On se propose ici de comparer les comportements métaboliques de deux clones racinaires : l'un où l'expression de la triosephosphate isomerase cytosolique (cTPI, EC 5.3.1.1) est diminué grâce à l'introduction d'un plasmide contenant une région codant pour un ARN antisens, et l'autre servant de contrôle contenant un plasmide « vide » autrement dit sans cette région codant pour l'ARN antisens.

Objectif

Dans le contexte de ce qui précède, ce projet de maîtrise s'est attardé à caractériser l'effet de la sous-expression de la cTPI sur le métabolisme végétal, à l'aide d'un modèle cinétique-métabolique.

Méthodologie

Pour réaliser cet objectif, les moyens suivants ont été mis en place :

1. Cultures cellulaires

Les cultures du clone *contrôle* et du clone *antisens cTPI* ont été réalisées en parallèle, en mode cuvée en erlenmeyers agités pour une durée totale de culture de 6,5 jours. Ces cultures ont été répétées de façon identique.

2. Mesure des concentrations métaboliques au cours du temps

Les cultures ont été échantillonnées quotidiennement. La masse fraîche racinaire a été relevée et de nombreuses mesures métaboliques ont été réalisées (sucres, nutriments inorganiques, sucres phosphatées, acides organiques) afin de qualifier l'état métabolique de notre système biologique d'étude (milieu + biomasse). Les mesures intracellulaires ont demandé une étape d'extraction importante puis les analyses ont été effectuées de plusieurs façons : analyse enzymatique, IC (Chromatographie échangeuse d'Ions), HPLC-MS (Chromatographie Haute Performance en phase Liquide et Spectrométrie de Masse)

3. Développement du modèle dynamique

Un modèle cinétique-métabolique illustrant les voies métaboliques majeures a été développé et codé pour être exécuté sur le logiciel Matlab (MathWorks). La calibration du modèle a été effectuée à l'aide des données expérimentales obtenues lors de ce projet de maîtrise.

4. Exploitation des résultats de simulations issus du modèle

Les données de concentrations et les simulations dynamiques obtenues ont été utilisées pour étudier et décrire le rôle de la cTPI à travers l'effet de la diminution de son expression.

Aussi ce mémoire de maîtrise comprend, tout d'abord, un premier chapitre regroupant une revue de littérature portant sur le métabolisme végétal non-photosynthétique, sur les méthodes expérimentales pour la caractérisation du métabolisme, sur les modèles utilisés, et enfin sur les racines chevelues comme système biologique. Le second chapitre présente un manuscrit pour fins de soumission au journal *Biotechnology and Bioengineering* présentant les méthodes de mesures d'intermédiaires métaboliques, le développement du modèle ainsi que les résultats obtenus expérimentalement et par simulations. Enfin, le troisième chapitre propose des éléments de discussion sur les résultats obtenus. Le manuscrit se termine par une conclusion sur les apports du travail de même que sur des recommandations.

Chapitre 1 REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Physiologie et métabolisme des cellules végétales

Cette section a pour but de décrire de manière non exhaustive les connaissances actuelles en termes de physiologie cellulaire et de métabolisme des cellules végétales en explicitant succinctement les principales voies métaboliques présentes en particulier dans les cellules végétales non photosynthétiques et représentées dans le modèle développé dans ce travail.

1.1.1 Physiologie des cellules végétales

Les cellules végétales sont des cellules eucaryotes ayant la particularité de présenter une paroi cellulosique (un polymère du glucose) en plus d'une membrane plasmique classique (bicouche de phospholipides). La Figure 1.1.1 donne une représentation schématique d'une cellule végétale.

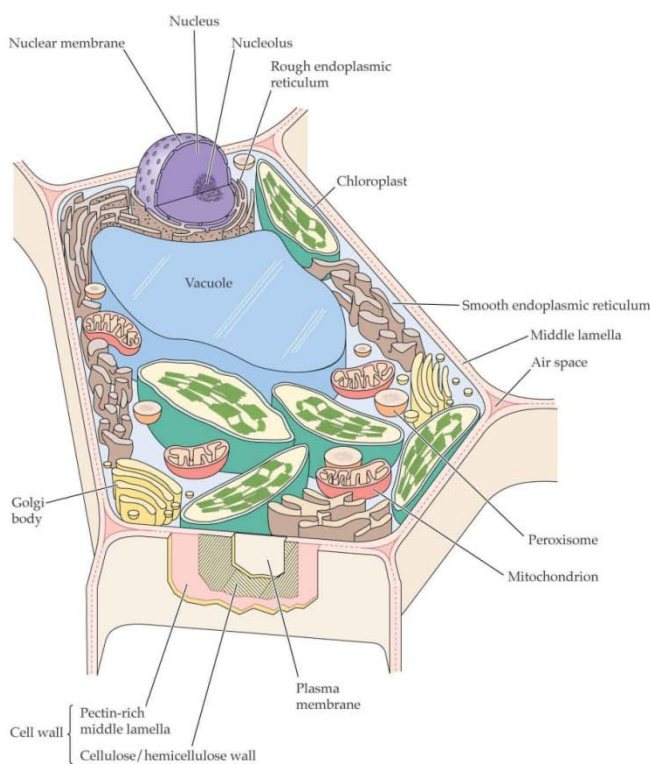


Figure 1.1 : Représentation schématique d'une cellule végétale (Buchanan, Buchanan, & Gruissem, 2009)

Ces cellules présentent de nombreux compartiments tels que noyau, mitochondrie, plaste, appareil de Golgi, vacuole, cytoplasme, ou encore des plastides, comme le chloroplaste. Ces différents compartiments ont des propriétés singulières. Le noyau contient la plus grande partie du matériel génétique, les mitochondries et les plastides possédant un petit génome. Dans les cellules photosynthétiques, la production d'énergie a lieu dans les chloroplastes et la mitochondrie. Les mitochondries, qui sont le siège du cycle de Krebs et de l'oxydation phosphorylante apportant la majeure partie de l'énergie d'une cellule non photosynthétique en conditions aérobies puisque les plastides présents dans ces cellules n'effectuent pas de photosynthèse.

1.1.2 Gestion des nutriments

Les cellules végétales non photosynthétiques ont besoin de trois grandes classes de nutriments : les glucides, l'ammonium/le nitrate, et le phosphate monovalent; chacun apportant les atomes constitutifs que sont le carbone (C), l'oxygène (O), l'hydrogène (H), l'azote (N) ou le phosphate (P). Il existe d'autres éléments tels que le potassium (K), le cobalt (Co), le magnésium (Mg), le calcium (Ca) ou encore le fer (Fe) (pour en nommer quelques-uns) également nécessaires aux cellules végétales mais dans quantités beaucoup plus faibles (Taiz & Zeiger, 2010). En outre, il a été démontré et quantifié (L. Lamboursain & Jolicoeur, 2005) que l'état nutritionnel de cellules végétales influençait fortement leur capacité à produire des métabolites secondaires d'intérêt. Autrement dit, la connaissance et la maîtrise de cet état est primordiale pour l'amélioration de la productivité de cultures de cellules végétales *in vitro*.

1.1.2.1 Carbone

Les cellules végétales non photosynthétiques tirent leur carbone de glucides tel que le saccharose (SAC) (sucrose en anglais), dimère de glucose (GLC) et fructose (FRU). Ce premier peut être hydrolysé soit en GLC et FRU via les invertases, situées au niveau de la paroi cellulaire, du cytosol ou de la vacuole (Sturm, 1999), soit en UDP-glucose (UDP-GLC) et FRU via l'enzyme saccharose synthase (Huber & Huber, 1996; Wolf, Grsic-Rausch, Rausch, & Greiner, 2003). La Figure 1.1.2 présente ces deux types de lyse.

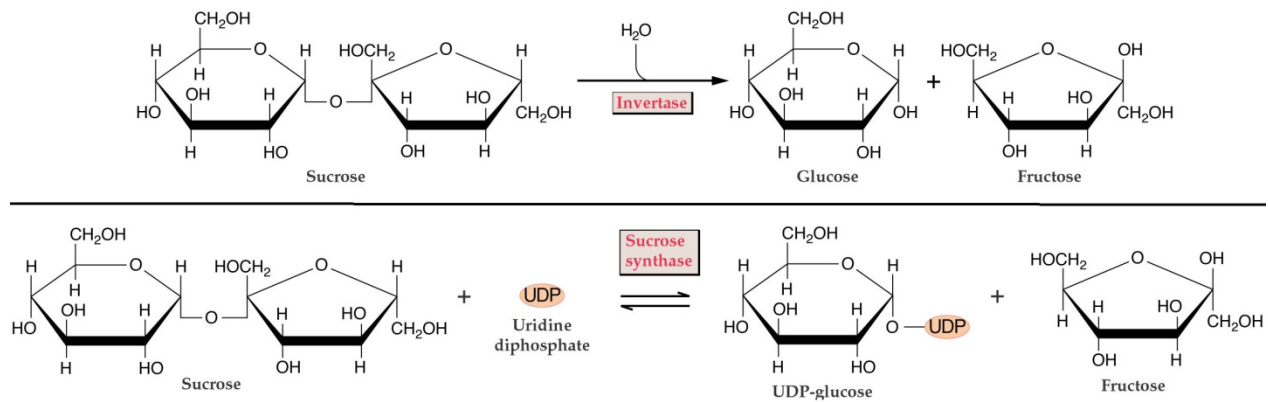


Figure 1.2 : Lyse du saccharose par les enzymes invertase et saccharose synthase

Le stockage du carbone peut avoir lieu ensuite sous forme d'amidon, long polymère de glucose dans les amyloplastes, organites de stockage. La Figure 1.1.3 illustre la synthèse d'amidon. Cette dernière commence par la phosphorylation du GLC en glucose-6-phosphate (G6P) puis l'isomérisation de ce dernier en glucose-1-phosphate (G1P). Ensuite, une étape importante consiste en la condensation d'une molécule d'ATP avec une molécule de G1P pour donner une molécule d'ADP-GLC et une molécule de pyrophosphate (PPi). Enfin, c'est cet ADP-glucose qui sert d'unité de polymérisation à l'amidon en libérant une molécule d'ADP (Dey, Harborne, & Bonner, 1997).

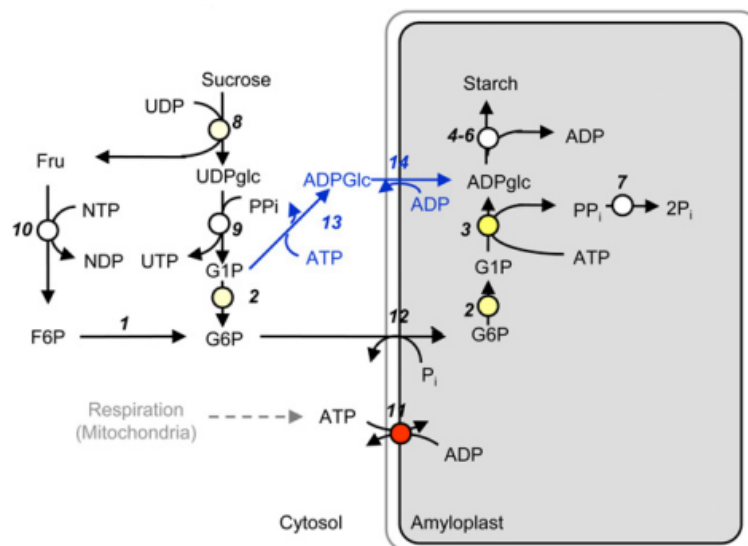


Figure 1.3 : Voie de synthèse de l'amidon

Les réserves d'amidon peuvent être hydrolysées afin de compenser un manque de source carbonée (Geigenberger, 2011). La dépolymérisation peut se faire par hydrolyse grâce à des amylases et des glucosidases et, en consommant du phosphate inorganique (Pi) par l'amidon phosphorylase qui génère du G1P (Dey et al., 1997).

1.1.2.2 Azote

L'azote est également un élément essentiel puisqu'il est nécessaire à la production d'acides aminés et des nucléotides, principalement. Il peut être absorbé par les cellules végétales sous forme d'ion ammonium (NH_4^+) ou de nitrate (NO_3^-) via au moins deux types de transporteurs: l'un dit à basse affinité, l'autre à haute affinité (transport secondaire actif dépendant d'une ATPase à H^+) (Crawford & Glass, 1998). De plus, une fois intégrés le nitrate est réduit par une *nitrate reductase* pour donner l'ion ammonium; seul ion azoté pouvant être directement utilisé par la suite par la biosynthèse de protéines et autres réactions biochimiques. L'ion ammonium est soit stocké dans la vacuole, soit intégré aux acides aminés via le glutamate.

Il faut noter que la quantité d'azote cytoplasmique, et son taux d'entrée dans la cellule (influx), sont fortement contrôlés par l'offre en composés azotés disponibles dans le milieu ainsi que par la demande (efflux) via la synthèse d'acides aminés principalement. Ainsi, il a été démontré que d'une part, le manque d'azote créait une stimulation importante des transporteurs liés aux composés azotés (Jackson, Kwik, & Volk, 1976) et d'autre part que cette stimulation était spécifique; autrement dit, seule la capacité d'absorption en azote était augmentée mais pas celle en phosphate ou en carbone, par exemple (Lee & Rudge, 1986).

1.1.2.3 Phosphate

Le phosphate est un élément clé du métabolisme végétal puisqu'il est impliqué dans de nombreuses réactions via les navettes énergétiques que sont l'ATP ou l'ADP, par exemple. Il constitue également un élément indispensable aux acides nucléiques ou aux phospholipides, constituants de la membrane cellulaire. Il est pourtant souvent limitant dans les sols, et il a été observé que seule la forme monovalente H_2PO_4^- est absorbée par les cellules végétales (Ullrich-Eberius, Novacky, & Bel, 1984).

Classiquement, les plantes s'organisent afin que la concentration en phosphate cytosolique reste constante, la vacuole servant de réservoir de contrôle pour garder cette consigne (Schachtman, Reid, & Ayling, 1998). Le phosphate étant un élément important, les cellules ont développé un système leur permettant son absorption de manière très efficace, souvent au moyen de plusieurs canaux. Les résultats scientifiques à cet égard considèrent l'existence de deux types d'absorption du phosphate : l'un dit à haute affinité, dont l'efficacité serait fonction du phosphate disponible dans le milieu, et l'autre dit à basse affinité dont l'activité serait intrinsèque à la lignée cellulaire (Furihata, Suzuki, & Sakurai, 1992; Raghothama & Karthikeyan, 2005).

1.1.3 Voies du métabolisme primaire

Le métabolisme primaire réunit les voies réactionnelles nécessaires à la nutrition, la croissance et au développement d'un organisme. Le métabolisme secondaire par opposition au primaire, vise à produire des molécules aux actions spécifiques (défense, communication, etc.) qui ne sont pas absolument nécessaires au développement de l'organisme. On distingue 6 grandes classes de réactions métaboliques (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2002) dont le Tableau 1.1 en présente la synthèse :

Tableau 1.1 : Types de réactions impliquées dans le métabolisme

Type de réaction	Description	Nomenclature <i>Enzyme Commission</i>
Oxydo-réduction	Transfert d'électron	EC 1 : Oxydoréductases
Transfert d'un groupe	Transfert d'un groupe fonctionnel d'une molécule à une autre	EC 2 : Transférases
Hydrolyse	Lyse de liaisons par une molécule d'eau	EC 3 : Hydrolases
Addition/Soustraction de groupes fonctionnels	Addition de groupes fonctionnels à une liaison double ou soustraction pour former une liaison double	EC 4 : Lyases
Isomérisation	Réarrangement d'atomes	EC 5 : Isomérases
"Ligation" impliquant une lyse d'ATP	Formation de liaisons covalentes	EC 6 : Ligases

Cette section vise à décrire les principales voies métaboliques primaires présentes dans les cellules végétales non-photosynthétiques; ces voies ont été intégrées dans le modèle mathématique développé dans ce travail : la glycolyse, la voie des pentoses phosphatés, le cycle de Krebs, l'oxydation phosphorylante et la synthèse des acides aminés (par famille).

1.1.3.1 Glycolyse

La glycolyse est une voie métabolique anaérobie fondamentale dont la finalité est double : elle permet l'oxydation des hexoses avec, en prime, la libération d'énergie sous la forme de 2 ATP et de 2 NADH, ainsi que la production de pyruvate, molécule fournissant le cycle de Krebs et certaines voies anaboliques. La glycolyse se déroule dans le cytoplasme et dans le plaste et ses voies sont réversibles pour soit dégrader des hexoses soit en former (gluconéogenèse). Une représentation est donnée en Figure 1.1.4.

La glycolyse fait intervenir de nombreuses enzymes nécessitant l'utilisation d'ATP, toutefois, des réactions alternatives, en cas de carence en phosphate, existent via l'utilisation de pyrophosphate (PPi) au lieu de phosphate (Pi) (W. C. Plaxton, 1999). De même, plusieurs travaux ont montré le rôle de la glycolyse dans l'adaptation à des stress divers tels qu'une limitation en nutriments (autre qu'en glucides), un choc osmotique, le froid ou la sécheresse (W. C. Plaxton, 1996). En particulier, les réactions catalysées par la *phosphofructokinase* (PFK) (EC 2.7.1.11) et la *pyruvate kinase* (PK) (EC 2.7.1.40) constituent deux points de régulation de la glycolyse. L'enzyme *triose phosphate isomérase* (TPI) (EC 5.3.1.1) permet l'isomérisation réversible entre le D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et la dihydroxyacétone phosphate (DHAP). La Figure 1.1.5 une représentation de la réaction d'isomérisation.

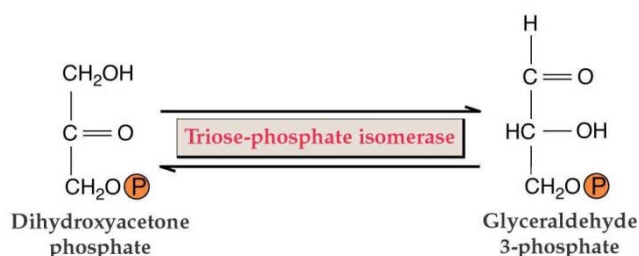


Figure 1.5 : Réaction d'isomérisation des trioses phosphates, catalysée par la TPI

A noter que le G3P sera utilisé dans la voie de la glycolyse pour donner ultimement le pyruvate, et que le DHAP est une molécule impliquée dans la voie des acides gras. Le DHAP est converti en glycérol-3-phosphate puis en glycérol, précurseur des triglycérides. La réaction d'isomérisation par la TPI est donc à l'embranchement entre la glycolyse et la synthèse de phospholipides. A noter également que la G3P intervient également dans la partie non-oxydative de la voie des pentoses phosphates.

La TPI est une enzyme dimérique décrite comme catalyseur parfait. En effet, une étude des paramètres cinétiques de la réaction (tracé du profil d'énergie libre de Gibbs, "turnover" de l'enzyme k_{cat}) relatent une valeur d'efficacité catalytique $\frac{k_{cat}}{K_m} = 10^8 \text{ molécules}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ indiquant que la réaction chimique est quasi-parfaite et que, la seule limitation cinétique est le transfert de matière via la diffusion du substrat vers le site actif de l'enzyme (Knowles & Albery, 1977). En particulier, la réaction dans le sens G3P vers DHAP est 20 fois plus favorisée que la

réaction inverse. Cependant, G3P étant constamment consommé pour la suite de la glycolyse, la réaction est donc déplacée dans le sens DHAP vers G3P (Harris, Cole, Comer, & Mildvan, 1998). Un seul mécanisme de régulation de la TPI a été décrit. Il s'agit d'une inhibition causée par une modification réversible avec du glutathion oxydé (Ito, Sakai, & Meyerowitz, 2003). La Figure 1.1.6 montre une représentation de la structure tridimensionnelle de la TPI.

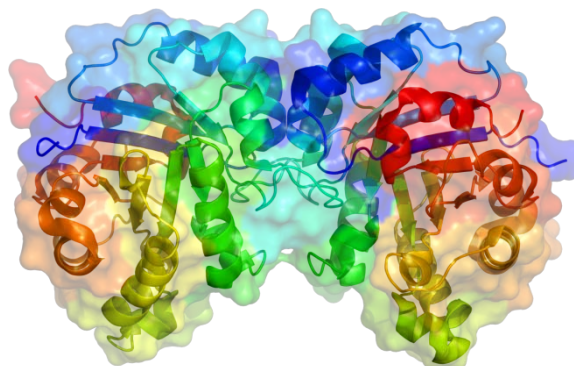


Figure 1.6 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la TPI

Enfin, la glycolyse donne lieu à la formation principalement de pyruvate mais certains intermédiaires sont des précurseurs d'autres voies métaboliques tels que le 3-phosphoglycérate ou le phosphoénolpyruvate respectivement impliqués dans la synthèse des acides aminés de la famille de la sérine et des acides aminés aromatiques.

1.1.3.2 Voie des pentoses phosphates

Cette voie partant du Glucose-6-Phosphate (G6P), vise à former principalement deux précurseurs que sont le ribose-5-Phosphate (R5P) et l'érythrose-4-Phosphate (E4P) utilisés respectivement pour la synthèse des nucléotides et la synthèse des acides aminés aromatiques. Elle permet également la production de pouvoir réducteur sous la forme de NADPH qui est utile à la synthèse des acides gras et à l'assimilation d'azote inorganique (Neuhaus & Emes, 2000). Cette voie métabolique se déroule au sein du cytoplasme en conditions aussi bien aérobies qu'anaérobies. La Figure 1.1.7 donne une représentation de cette voie (Kruger & von Schaewen, 2003).

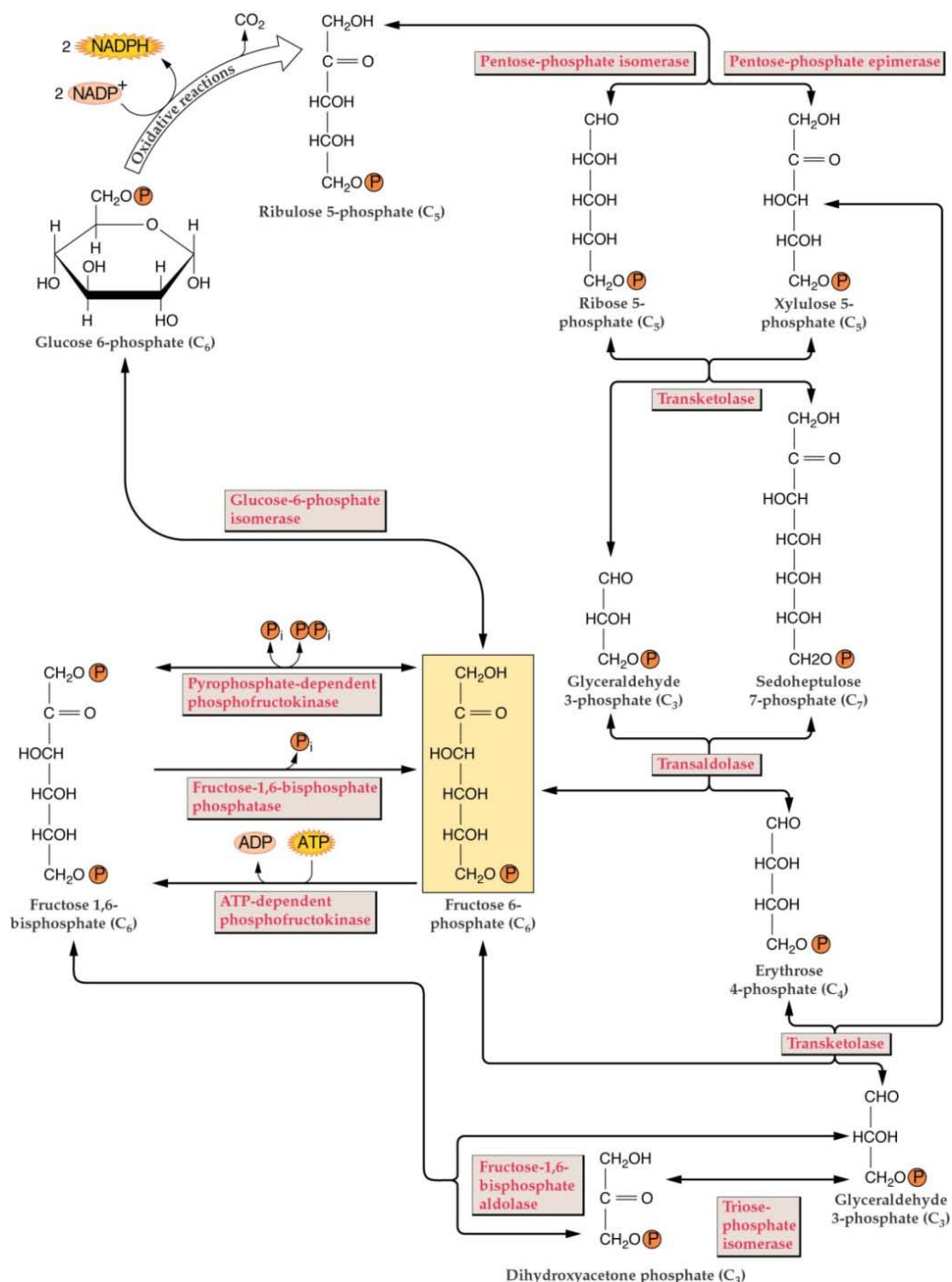


Figure 1.7 : Représentation de la voie des pentoses phosphates et liens avec la glycolyse

Il faut noter que la glycolyse et la voie des pentoses phosphates communiquent par plusieurs embranchements. Autrement dit, lors d'un besoin ponctuel en un intermédiaire particulier généré soit dans la glycolyse ou la PPP, le carbone coulera momentanément préférentiellement vers la voie en question pour répondre à la demande. Il est de plus admis, que la voie des

pentoses phosphates est en partie contrôlée par les concentrations en $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, constituant du pouvoir réducteur pour la suite. En particulier, la première réaction, catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) est l'étape limitante de la voie des pentoses phosphates, dont elle contrôle le flux (Hames & Hooper, 2005; Kruger & von Schaewen, 2003).

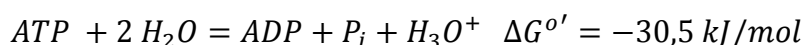
1.1.3.3 Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, ou cycle de l'acide citrique, est un pilier essentiel du métabolisme et se déroule au sein des mitochondries. Il possède un double rôle: d'une part, il est associé au catabolisme par l'oxydation de molécules carbonées (donnant du pouvoir réducteur utile pour l'oxydation phosphorylative - voir section suivante) et il est d'autre part impliqué dans l'anabolisme par la production de nombreux précurseurs d'acides aminés, dont par exemple l'aspartate ou le glutamate (Mackenzie & McIntosh, 1999).

A la fin de la glycolyse, du pyruvate (PYR), molécule à 3 carbones, a été généré. Ce dernier sera par la suite décarboxylé (passage à 2 carbones) et réagira avec une coenzyme A pour donner l'acétyl coenzyme-A (ACoA), point d'entrée du cycle de Krebs. La Figure 1.1.8 présente une représentation schématique.

1.1.3.4 Oxydation phosphorylante

Cette étape cruciale du métabolisme aérobie impliquant l'oxygène, vise à fournir de l'ATP à la cellule à partir de l'ADP. La réaction de synthèse d'ATP à partir d'ADP et de P_i n'est pas thermodynamiquement favorisée puisque, c'est son hydrolyse qui l'est :



Il faut donc générer l'énergie nécessaire pour la réaction contraire. Des intermédiaires réducteurs (donneurs d'électrons) en la forme de NAD(P)H ou $FADH_2$ formés via la glycolyse, le cycle de Krebs et la voie des pentoses phosphates seront alors utilisés. Ces électrons sont alors transférés via plusieurs étapes sur une chaîne de transporteurs (dite chaîne respiratoire) pour arriver finalement à l'oxygène, receveur ultime d'électrons. Ces réactions d'oxydoréductions induisent un fort gradient électrochimique $\Delta\Psi$ de part et d'autre de la membrane mitochondriale. C'est ce gradient qui prodigue l'énergie nécessaire à l'enzyme *ATP synthétase* pour reformer de l'ATP à partir de P_i et d'ADP, réaction appelée oxydation phosphorylante (Siedow & Umbach, 1995). La Figure 1.1.9 donne une représentation schématique de cette voie métabolique.

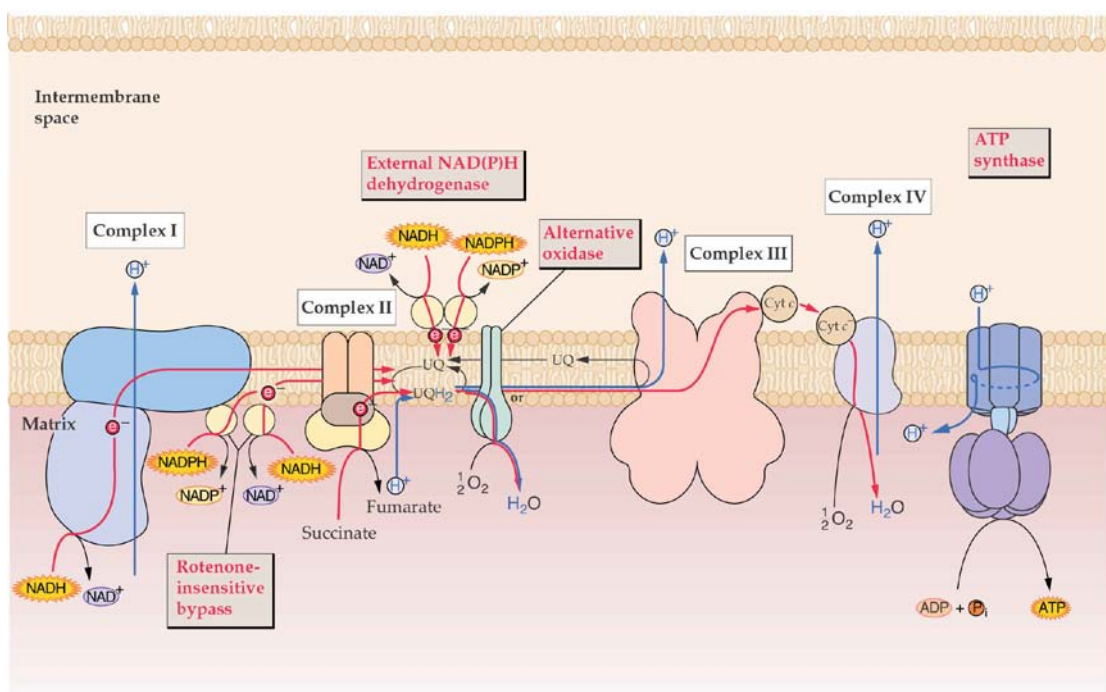


Figure 1.9 : Oxydation phosphorylante chez les cellules végétales (Buchanan et al., 2009)

En outre, une manière de mesurer l'état énergétique cellulaire est l'indice de Charge Énergétique d'Atkinson défini en fonction des concentrations en ATP, ADP et AMP (Atkinson, 1968) :

$$\text{Indice de Charge Energétique (ICE)} = \frac{[ATP] + [ADP]/2}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

Cet indice peut aller de 0 (tout sous forme d'AMP) à 1 (tout sous forme d'ATP). De plus, le métabolisme cellulaire est régulé de telle sorte à rester dans une plage de valeurs assez restreinte aller normalement de 0,75 à 0,95 (Theobald, Mailinger, Reuss, & Rizzi, 1993). Il a été observé qu'il y avait un lien entre niveau énergétique (représenté par l'ICE) et le niveau des flux métaboliques anaboliques et cataboliques. Autrement dit, lorsque l'énergie est plutôt sous forme d'ATP (i.e. ICE proche de 1), les voies anaboliques sont favorisées et inversement si l'énergie est « manquante » (i.e. peu d'ATP ou ICE faible), les voies cataboliques (permettant la synthèse d'ATP) sont favorisées.

1.1.3.5 Synthèse des acides aminés

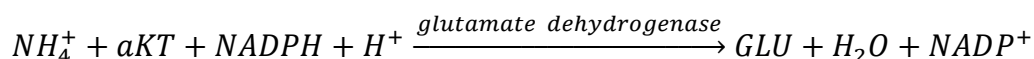
On dénombre 5 grandes familles d'acides aminés selon leur provenance au sein du métabolisme:

- famille du glutamate : arginine, proline, glutamate, glutamine, acide γ -aminobutyrique
- famille de l'aspartate : aspartate, asparagine, thréonine, méthionine, lysine et isoleucine
- famille du pyruvate : valine, leucine, alanine
- famille de la sérine : glycine, sérine, cystéine
- famille du shikimate : tryptophane, phenylalalanine, tyrosine et l'histidine, aromatique également mais en marge des trois premières en terme de provenance métabolique.

Les acides aminés sont les précurseurs des protéines et les cellules végétales, contrairement aux cellules de mammifère, possèdent les voies métaboliques pour la production de chacun d'entre eux. Les protéines peuvent avoir des nombreux rôles : structurel, métabolique (les enzymes étant des protéines à propriété catalytique), transporteurs ou encore de réserve d'acides aminés.

La synthèse d'un acide aminé repose sur deux grandes étapes :

- 1) Une *amination réductrice* impliquant le cofacteur NADPH, où l'ion ammonium vient réagir avec l'alpha-ketoglutarate (aKT) issu du cycle de Krebs pour donner l'acide glutamique (GLU) (acide conjugué du glutamate)



Cette réaction se déroule dans la mitochondrie et le glutamate devient le donneur principal de groupe aminé pour les synthèses ultérieures. Cependant, la glutamate déshydrogénase est principale catabolique (réaction de droite à gauche) et la synthèse de glutamate se fait principalement à l'aide du cycle glutamine-synthétase/glutamate synthase (GS-GOGAT) dans le plaste, présenté sur la Figure 1.1.10.

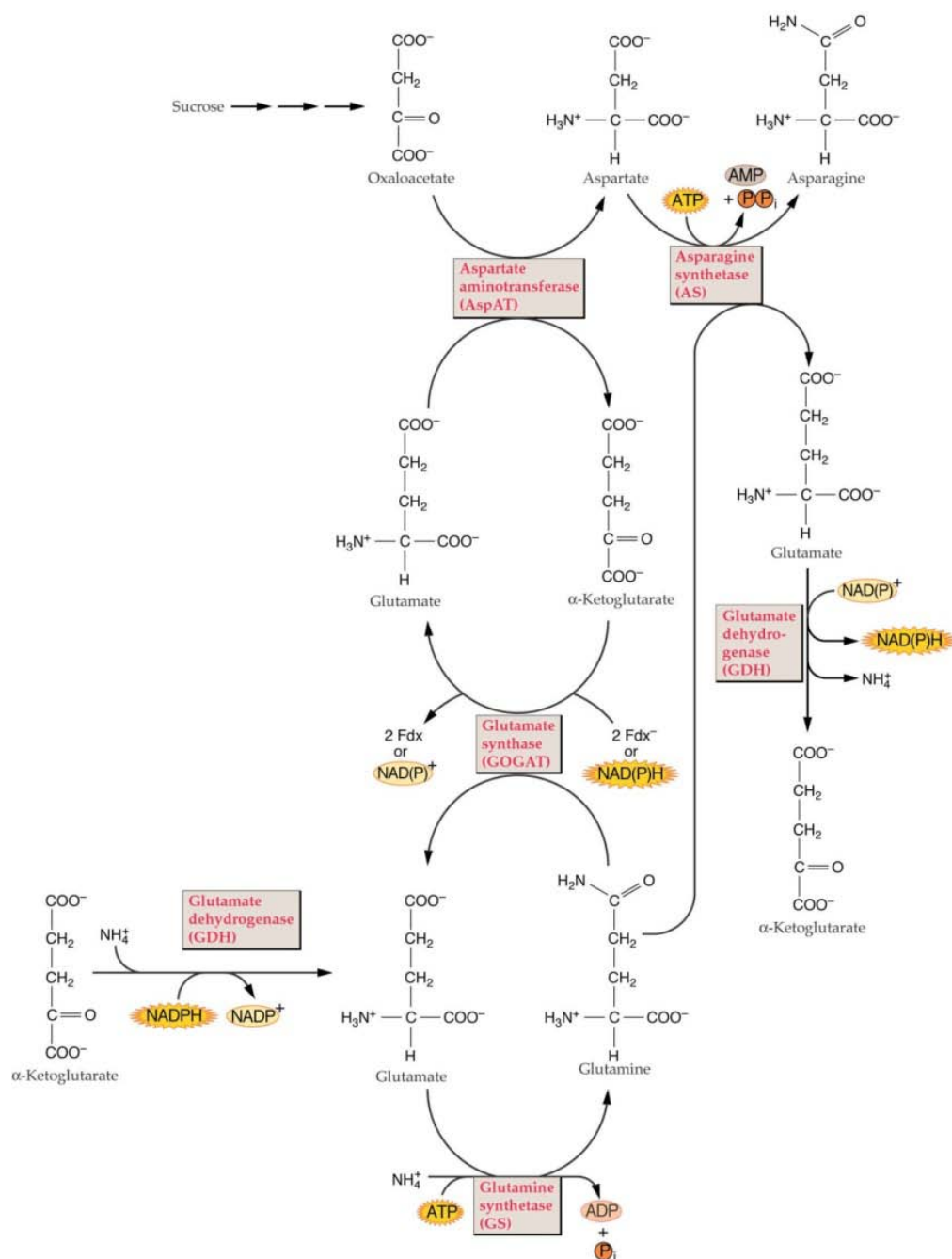


Figure 1.10 : Cycle GS/GOGAT (Buchanan et al., 2009)

- 2) Une *transamination* (réalisée par les *aminotransférases* ou *transaminases*) correspondant au transfert du groupe amine d'un donneur (souvent le glutamate (GLU) ou l'aspartate) à un acide cétonique, souvent un intermédiaire du cycle de Krebs comme l'oxaloacétate (OXA).

Les transaminases sont des enzymes qui permettent le déplacement de groupements amines et peuvent donc être impliquées soit dans la synthèse (anabolisme) ou la dégradation (catabolisme) d'acides aminés.

La Figure 1.1.11 donne un schéma général de cette transamination.



Figure 1.11 : Réaction de transamination

La Figure 1.1.12 résume les principales voies de biosynthèse des acides aminés

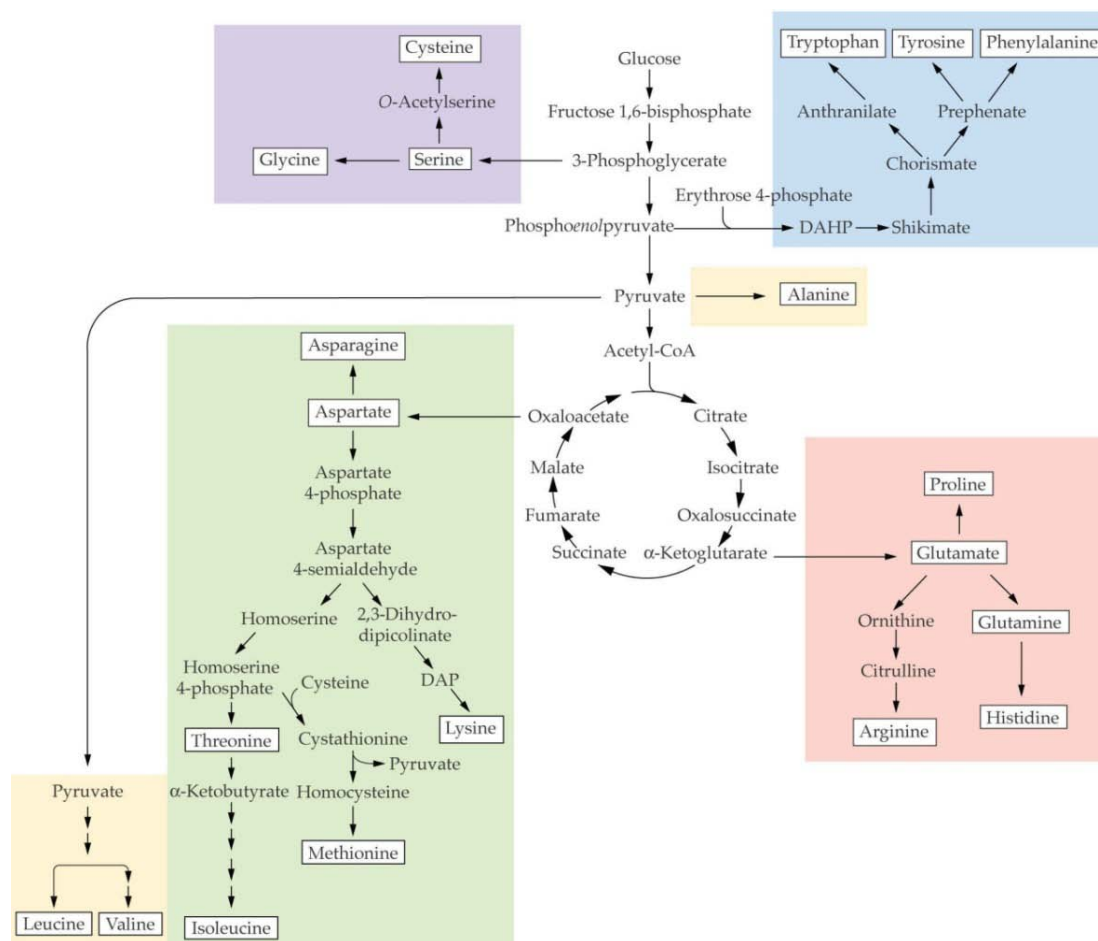


Figure 1.12 : Représentation des voies de synthèse des famille d'acides aminés (Buchanan et al., 2009)

1.2 Caractérisation métabolique des cellules végétales

1.2.1 Génie et modélisation métaboliques

Le génie métabolique est défini dans (Stephanopoulos, Aristidou, ~~Nielsen~~, & Nielsen, 1998) par « l'amélioration directe de niveaux de production de molécule d'intérêt ou de propriétés cellulaires, via la modification de réactions biochimiques particulières ou par l'introduction de nouvelle(s) réaction(s), à l'aide de la technologie de l'ADN recombinant » (*traduis de l'anglais*). Aussi, d'un point de vue plus fondamental, il se veut un outil de compréhension du fonctionnement cellulaire : il permet de décrire systématiquement l'utilisation des nutriments, la synthèse de métabolites primaires et secondaires, la stœchiométrie du réseau métabolique, les valeurs des flux et cinétiques de réactions (Stephanopoulos et al., 1998). L'étendue d'application

du domaine dépasse de loin le sujet de ce travail mais les applications sont nombreuses en agroalimentaire, pharmaceutique, environnement etc.

Le métabolisme est constitué d'un réseau de réactions biochimiques régulées que le scientifique œuvre à modéliser pour mieux le décrire et surtout, le prédire. La Figure 1.2.1 résume plusieurs approches de modélisation métabolique. Le travail de modélisation présenté dans ce mémoire se situe dans la catégorie des « modèles cinétiques ».

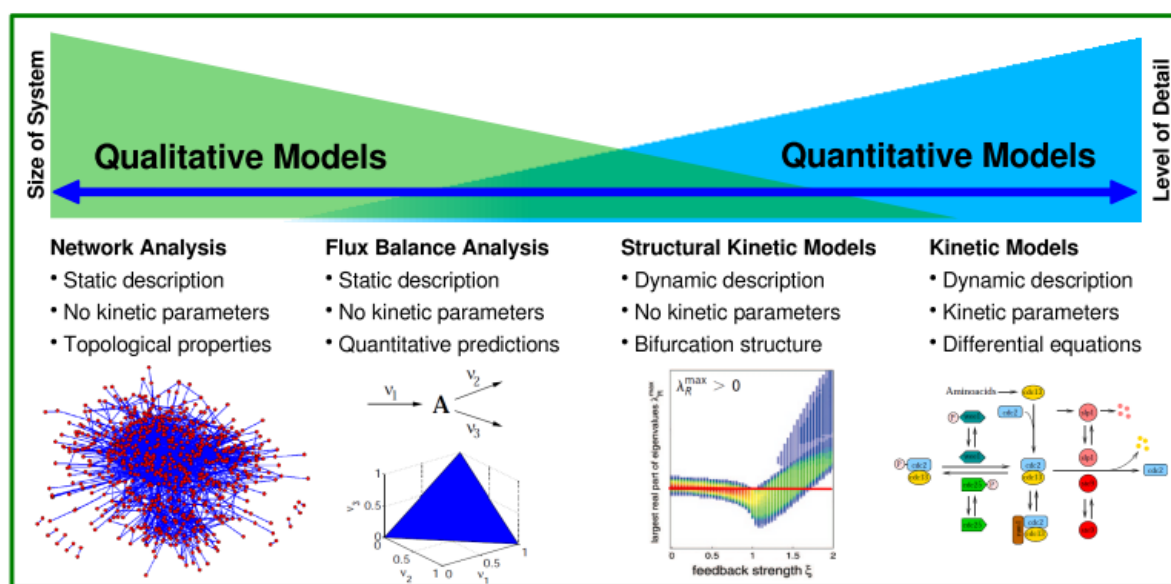


Figure 1.13 : Différentes approches en modélisation métabolique (Ralf, 2007)

Chacune des techniques a ses avantages et ses limites, certaines approches donnant des informations qualitatives plus que quantitatives, mais en se basant sur peu de données expérimentales et vice-versa. Les approches en modélisation sont nombreuses : nous allons décrire succinctement ici les plus utilisées à savoir l'analyse du contrôle métabolique (MCA), l'analyse des flux métaboliques (MFA) et la modélisation cinétique.

1.2.1.1 L'analyse du contrôle métabolique ("*Metabolic Control Analysis*")

L'analyse du contrôle métabolique est une approche mathématique, visant à quantifier l'effet d'une modification du niveau d'activité effective d'une enzyme sur les flux et les concentrations d'une voie métabolique, non nécessairement associée à l'enzyme étudiée. Un des exemples typiques d'application est la recherche de l'accumulation en amidon de pommes de terre (Morandini, 2009). La pensée traditionnelle estimait qu'il faille se concentrer sur les réactions

ayant une enthalpie libre $\Delta G^{o'}$ fortement négative (i.e. des réactions éloignées de l'équilibre). Néanmoins, il faut noter que même si de prime abord cette approche semble séduisante, elle a malheureusement souvent ramené le chercheur à faire office d'humilité face à une complexité biologique qu'il est incapable d'expliquer avec précision pour l'instant. En effet, après avoir identifié les étapes enzymatiques à haut $\Delta G^{o'}$, deux approches ont été testées sur des enzymes de la voie menant à l'amidon. Dans un premier temps, les enzymes impliquées dans les réactions d'entrée de la voie de biosynthèse de l'amidon (réactions 1, 2 et 9 sur la Figure 1.1.3) ont été surexprimées par génie génétique. Cette approche est appelée « push from above », ou forcer la voie par le haut. Dans un deuxième temps, les enzymes impliquées dans les réactions terminales de la voie de biosynthèse de l'amidon (réactions 3, 4 et 6 sur la Figure 1.1.3 **Error! Reference source not found.**) ont été à leur tour surexprimées, selon une approche dite « pulling from below », ou tirer la voie par le bas. Ces deux opérations ont cependant pour la très grande majorité des cas mené à des échecs avec l'augmentation de la respiration des tissus végétaux et la diminution de la production d'amidon, voire aucun changement.

En MCA, des coefficients de contrôle C^j sont alors définis comme des mesures de l'effet d'une modification du niveau d'une enzyme sur le flux ou la concentration considéré (Fell & Sauro, 1990). L'étude de ces coefficients permettrait d'identifier l'enzyme clé qui potentiellement, moyennant une modification génétique du niveau d'expression, augmenterait la productivité d'une molécule d'intérêt (Rios-Esteva & Lange, 2007; Visser & Heijnen, 2002). Dans le cas de l'amidon, la modification du niveau de l'*adenalyte translocator* ou l'*adenalyte kinase* au coefficient de contrôle C^j proche de 1 (mais à l'enthalpie libre proche de 0) a permis d'obtenir une accumulation d'amidon (Tjaden, Möhlmann, Kampfenkel, & Neuhaus, 1998). Il faut cependant nuancer le propos, car l'étude seul des coefficients C^j ne suffit pas, les résultats n'étant parfois pas ceux attendus (Morandini, 2009). En conclusion, ces résultats illustrent le fait que le réseau métabolique est hautement régulé et ce, sur plusieurs niveaux (génomique, transcriptomique, protéomique et métabolique) et qu'il peut être très hasardeux de conduire une étude en raisonnant sur une réaction de manière thermodynamique et en ne considérant qu'une unique enzyme.

1.2.1.2 L'analyse des flux métaboliques (Metabolic Flux Analysis)

Une autre approche est nommée analyse des flux métaboliques et a permis de conduire des études de compréhension du métabolisme cellulaire depuis quelques décennies en faisant appel à un nombre restreint de données (souvent obtenues par marquage isotopique), complétées par une importante hypothèse de régime stationnaire, qui combinée à des outils bien connus d'algèbre linéaire (Libourel & Shachar-Hill, 2008) permettent d'obtenir des valeurs de flux métaboliques. Cependant, cette approche étant statique, c'est-à-dire qu'elle requiert l'hypothèse d'un régime quasi stationnaire, elle est incapable de rendre compte de la dynamique du métabolisme (Rios-Esteba & Lange, 2007). Due à cette limitation importante d'analyse, la communauté de chercheurs en génie métabolique s'est tournée vers le développement d'une modélisation dynamique faisant intervenir les cinétiques de réactions biochimiques. En particulier pour les cellules de plante, l'approche par analyse des flux métaboliques peut difficilement être appliquée car l'hypothèse de régime stationnaire est souvent réfutée à cause de processus de stockage (Libourel & Shachar-Hill, 2008). Chez les cellules de mammifères ou les bactéries, cette hypothèse est plus acceptable en phase exponentielle de croissance, quoi que parfois limite.

1.2.1.3 Les modèles cinétiques

Le fait d'inclure les dynamiques enzymatiques est donc une réponse à la question : comment modéliser le métabolisme qui est dynamique dans le temps ? Cependant, le développement de modèles décrivant les cinétiques enzymatiques comporte des inconvénients tels que le besoin important de données expérimentales pour permettre d'estimer avec précision une quantité importante de paramètres cinétiques (V_{max} et K_M pour des cinétiques de Michaelis-Menten par exemple) (Jörg Schwender, 2009). Cependant, une fois cette étape de validation passée, le modèle peut s'avérer prédictif et donc devenir un outil utile à diverses études dont la simulation de comportements cellulaires, en particulier dans le cadre de la définition de stratégies de gestion de la composition du milieu de culture tel qu'effectué par (M. Cloutier et al., 2009; Jörg Schwender, 2009). Les modèles cinétiques ont gagné en popularité ces dernières années, avec un passage de modèles macroscopiques (non structurés) à des modèles faisant apparaître les réactions du métabolisme (modèles dits structurés). Ce passage a été rendu possible compte tenu des possibilités informatiques pour le traitement de grands nombre d'équations. Ces modèles ont alors été aussi bien appliqués à des microorganismes (Chassagnole, Noisommit-Rizzi, Schmid,

Mauch, & Reuss, 2002; Stewart, Navid, Turteltaub, & Bench, 2010; Usuda et al., 2010) que des cellules végétales (Rios-Estépa & Lange, 2007; Rohwer & Botha, 2001) ou de mammifères (Liu et al., 2010; Nolan & Lee, 2011).

Un exemple de modèle cinétique métabolique pour du végétal, prenant en compte la plupart des nutriments et les métabolismes primaire et secondaire, chez des racines chevelues de *Carantheus roseus* est donné par (M. Cloutier, Perrier, & Jolicoeur, 2007; Leduc, Tikhomiroff, Cloutier, Perrier, & Jolicoeur, 2006). Ce modèle est basé sur des données nutritionnelles (sucres et ions) principalement. Ce modèle s'est avéré capable de prédire correctement la croissance cellulaire et la gestion des nutriments du milieu de culture, et ce pour plusieurs espèces végétales tant en cellules en suspension (*C. roseus*, *Eschscholtiza californica*) qu'en racines chevelues (carotte). Une des limites cependant consistait en l'hypothèse d'un régime stationnaire pour les métabolites du métabolisme primaire et le peu de données intracellulaires disponibles. Poursuivant le développement du modèle, (M. Cloutier et al., 2009) ont réalisé des études fines par RMN du phosphore ^{31}P afin de comprendre la dynamique de gestion du phosphate entre le milieu de culture, le cytosol et la vacuole de cellules d'*Eschscholtiza californica*. Le modèle a ensuite pu être employé pour prédire la quantité de phosphate intracellulaire par compartiment et même à son utilisation pour le contrôle du Pi cytoplasmique et pour déterminer les conditions d'alimentation en mode cuvée-alimentée ("fed-batch") maximisant la production en métabolites secondaires.

1.2.2 Mesures métaboliques

Les mesures métaboliques sont particulièrement critiques puisqu'elles ont pour objet l'analyse de molécules très réactives, faiblement concentrées dans les cellules et issues d'un milieu biologique complexe et riche en molécules différentes et réactives, dont des enzymes. Trois étapes composent une mesure métabolique : le blocage du métabolisme lors de l'échantillonnage, l'extraction des molécules d'intérêt et leur identification chimique et leur quantification à proprement parler. La Figure 1.2.2 illustre un protocole typique à suivre pour effectuer une série d'analyses métaboliques menant à un estimé exact de l'état cellulaire au temps d'échantillonnage. A noter que selon le cas, on voudra séparer la biomasse du milieu au moment de l'échantillonnage afin de distinguer les nutriments et métabolites intra et extracellulaire.

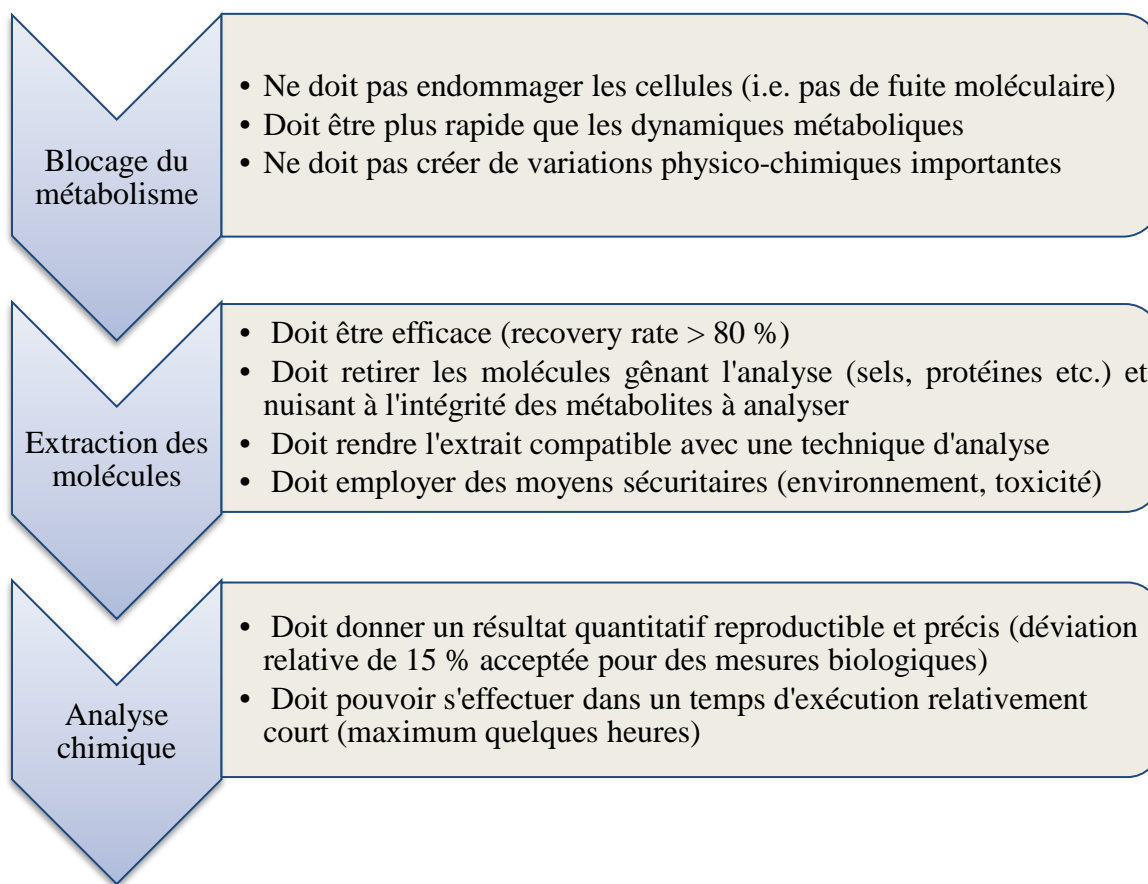


Figure 1.14 : Étapes composant une mesure du métabolisme idéale

1.2.2.1 Blocage du métabolisme

Lors d'une mesure métabolique, les nombreuses étapes de manipulation de l'échantillon biologique doivent être le plus neutre possible vis-à-vis des molécules à analyser et ainsi biaiser le moins possible le résultat. Autrement dit, à cette étape on cherche à interrompre le plus rapidement possible tout processus biochimique qui pourrait modifier les concentrations moléculaires et donc donner un résultat non représentatif de l'état cellulaire au moment de l'échantillonnage. Cette étape est également particulièrement critique puisqu'elle arrive en premier dans les étapes reliées à une mesure de métabolites.

Les méthodes d'interruption du métabolisme (quenching) consistent typiquement à amener l'échantillon dans des conditions extrêmes de pH ou de température permettant ainsi la dénaturation rapide des enzymes, sans toutefois altérer les métabolites d'intérêt (Álvarez-Sánchez, Priego-Capote, & Castro, 2010). La première méthode s'effectue par l'ajout de soude ou d'un acide fort tels que les acides trichloracétique ou perchlorique (Mashego et al., 2007). La

seconde consiste à amener l'échantillon en dessous de -20°C via l'ajout d'une solution aqueuse de méthanol froid (plus bas que -40°C) ou via de l'azote liquide à -196°C (Dettmer, Aronov, & Hammock, 2007; Hiller, Franco-Lara, Papaioannou, & Weuster-Botz, 2007). Le méthanol a l'avantage d'être miscible avec l'eau et d'avoir une température de gel plus faible que l'éthanol ou le glycérol. Cependant, il crée une perméabilisation cellulaire qui biaisera les mesures si l'on souhaite distinguer exo et endométabolome : il faut donc pour cela effectuer une séparation (par centrifugation par exemple) de la biomasse du milieu de culture. Enfin, on évite parfois l'augmentation de température car elle peut mener à la dégradation de molécules thermolabiles.

Cette étape d'échantillonnage constitue un niveau de difficulté majeur, pour les procédés biotechnologiques qui cherchent à suivre l'état métabolique des cellules en ligne (supporté au niveau industriel par les *Process Analytical Technology*), de manière automatisée (mesures « on-line » voire « at-line »). Néanmoins, plusieurs systèmes ont été développés, dont un basé sur un échantillonneur connecté au bioréacteur, porté à -50°C et 200 mbar, associé à une solution aqueuse 60% en méthanol et utilisé avec des bactéries et levures (Hiller et al., 2007). A nouveau, on peut questionner ici la possible contamination du milieu extracellulaire par le contenu intracellulaire causée par la perméabilisation membranaire en présence de méthanol.

1.2.2.2 Extraction des molécules d'intérêt

Selon l'approche (ciblée ou plus générale), on va soit cibler une famille de molécules en particulier (alcaloïdes, lipides etc.) ou essayer d'utiliser une méthode d'extraction la plus polyvalente possible (maximum de molécules extraites à la fois). Le choix est souvent issu d'un équilibre entre nombre de molécules extraites et efficacité d'extraction. En effet, il est difficile de trouver une méthode capable d'assurer une extraction maximale pour l'ensemble des métabolites visés. Cela s'explique par des différences de solubilité (molécules polaires ou non par exemple) et l'instabilité de certaines molécules dans tel ou tel solvant (Álvarez-Sánchez et al., 2010). D'autre part, un désavantage majeur des mesures métaboliques avec extraction est leur aspect invasif et destructif qui, couplé à l'instabilité des molécules étudiées peut donner des résultats fortement biaisés (Ritter, Genzel, & Reichl, 2008).

En particulier, les cellules végétales possèdent une deuxième barrière (une paroi cellulosique semi-rigide) en plus de la membrane plasmique. Ainsi, afin de libérer le contenu cellulaire on voudra souvent rompre la paroi via une rupture mécanique grâce à un mortier et un pilon, par

exemple à petite échelle, un broyeur à boulet (*ball mill*) ou encore un broyeur vibrant (*vibration mill*) industriellement (Schauer, Zamir, & Fernie, 2005).

Selon l'application il est répandu d'utiliser des acides forts tels que l'acide trichloroacétique (TCA) ou l'acide perchlorique (PCA) en solution aqueuse. Le problème de cette méthode est son caractère agressif. Ces acides sont de bons solvants pour un certain nombre de petites molécules biologiques hydrophiles (sucres phosphatés, nucléotides, ions etc.) et ont l'avantage de permettre la désactivation d'enzymes critiques tels que les phosphatases et les hydrolases. Cependant, injecter ensuite un tel mélange en colonne HPLC n'est pas recommandé car il est souvent très agressif pour la phase fixe et en diminue la durée de vie. Dans certains cas (pour l'acide perchlorique par exemple), on aura recours en plus à une neutralisation basique avant injection.

C'est pourquoi on essaie désormais de se diriger vers des méthodes moins agressives basées sur l'utilisation de méthanol ou d'éthanol en solution aqueuse, et ces dernières ont été démontrées satisfaisantes pour l'analyse des acides organiques et sucres phosphatés, par exemple (Antonio et al., 2007). Par la suite, on peut alors favoriser l'extraction par agitation, sonication, micro-ondes, utilisation de fluides supercritiques ou encore via des techniques classiques de chimie organique tels qu'à l'aide d'un appareil à Soxhlet (Álvarez-Sánchez et al., 2010).

Enfin, une des limitations des mesures métaboliques par extraction est l'incapacité à rendre compte de la compartimentation du volume intracellulaire. Une méthode récente appelée "*Non aqueous Fractionation*" (NAF) repose sur la différence de solubilité des organites dans un solvant donné. Cette méthode relativement marginale permet cependant de donner une idée de la distribution relative d'une molécule donnée dans les différents compartiments (plastides, cytosol, mitochondrie etc.) de la cellule (Geigenberger, Tiessen, & Meurer, 2011).

1.2.2.3 Analyses chimiques métaboliques

Les techniques d'analyses chimiques ont énormément évolué lors des dernières années en particulier au niveau de leur polyvalence. En effet, pendant longtemps les expertises en chimie analytique permettaient la mesure de molécules de familles spécifiques tels que les alcaloïdes, lipides, ions, ou encore les sucres. Désormais le paradigme est différent et l'utilisation couplée de techniques variées et leur amélioration continue ont amené une plus grande polyvalence de celles-ci. De même, la sensibilité (ou seuil de détection) devient de plus en plus importante et des

par spectrométrie de masse. Si de nombreuses techniques existent, certaines se sont particulièrement répandues à savoir la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la chromatographie liquide/gazeuse (LC ou GC) en tandem avec la spectrométrie de masse (MS).



Figure 1.15 : Échelle des seuils de détection de différentes techniques d'analyse chimique

Le choix d'une technique par rapport à une autre consiste souvent en un compromis entre rapidité d'analyse, sélectivité et sensibilité. Par exemple, la RMN est rapide et sélective mais est peu sensible alors que la GC/MS ou LC/MS ont une bonne sensibilité et sélectivité mais un temps d'analyse relativement plus long (Sumner, Mendes, & Dixon, 2003).

Spectroscopie RMN

La spectroscopie RMN est une technique physique reposant sur la propriété de certains noyaux atomiques (tels que ^1H , ^{13}C , ou ^{31}P) de réagir spécifiquement à des rayonnements électromagnétiques. Les noyaux absorbent puis relâchent (relaxation) de l'énergie à une fréquence précise de résonance, selon l'intensité et la fréquence du champ magnétique imposé et de l'environnement quantique de l'atome. Ce comportement en fréquence permet alors de distinguer un noyau atomique d'un autre, de même que discriminer entre des environnements chimiques différents.

Cette technique non destructive et non invasive possède des applications en chimie et biologie en permettant des études dynamiques suivant l'effet d'un stimulus comme une modification du pH, de l'oxygène dissous, etc. Néanmoins, son seuil de détection est relativement une faiblesse car il est de l'ordre du millimolaire (voire du micromolaire); ce qui oblige à l'utiliser pour des mesures métaboliques de concentrations relativement élevées, ou accumuler les spectres sur plusieurs minutes voire heures afin d'aboutir à un bon rapport signal à bruit. La RMN appliquée aux plantes entières ou sur des cellules en suspension (Ratcliffe & Shachar-Hill, 2005) est une technique qui a permis la résolution de certains aspect métaboliques.

En outre, un mini-bioréacteur permettant la culture de cellules végétales (Gmati, Chen, & Jolicoeur, 2005) ou de mammifères (Ben-Tchavtchavadze, Chen, Perrier, & Jolicoeur, 2010) a permis un suivi par RMN dynamique des navettes énergétiques que sont l'ATP/ADP/AMP par suivi du ^{31}P . De plus, de par la différence de pH entre la vacuole et le cytosol, il est possible de distinguer le phosphate vacuolaire du phosphate cytoplasmique.

Chromatographie en phase liquide (CPL) ou gazeuse (CPG)

Le principe de la chromatographie est de séparer les composants (analytes) de l'échantillon à analyser dans une colonne où circule l'échantillon en phase liquide suite à des injections séquentielles, pour pouvoir mesurer leur concentration respective un à un face à un détecteur. Une phase fixe (solide) constituée classiquement d'une résine aux propriétés particulières: taille, polarité, ramification, chiralité etc. permet de retenir plus ou moins les analytes. Une phase mobile (liquide ou gazeuse) appelée éluant, permet de transporter les molécules à analyser le long de la colonne de séparation. Cette phase peut être un mélange aux propriétés particulières (débit, pH, forces de Van der Waals, etc.), qui peuvent être modulées au cours d'une analyse, et qui sont déterminées par l'utilisateur pour améliorer la résolution des pics. La détection peut se faire ensuite par mesure optique (absorbance ou fluorescence) ou encore par mesure électrique pour des réactions d'oxydoréduction et même sur un spectromètre de masse ou une RMN. On peut également coupler les chromatographies pour une même analyse comme un tandem CPG-CPG ou CPL-CPL afin d'obtenir une meilleure résolution.

Cette technique est très largement utilisée pour des mesures métaboliques mais l'une ou l'autre sera privilégiée selon la nature des molécules à détecter (plus ou moins polaires) (Theodoridis, Gika, & Wilson, 2008). La Figure 1.2.4 montre le type de phase à choisir.

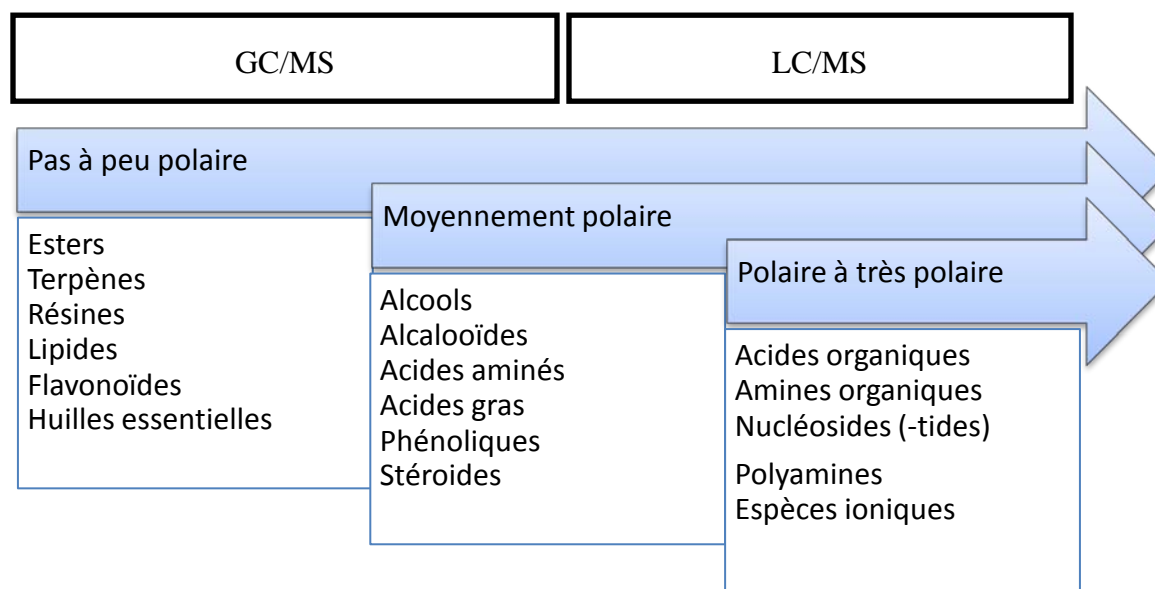


Figure 1.16 : Utilisation GC ou LC pour des mesures métaboliques

Une avancée importante a été celle de l'utilisation des colonnes dites HILIC (pour 'hydrophobic interaction chromatography') pour la détection de nombreuses molécules polaires du métabolisme végétal (Tolstikov & Fiehn, 2002).

Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) permet quant à elle, l'identification de molécules par leur masse atomique. L'appareil ionise les molécules puis ces dernières sont détectées selon le ratio masse sur charge (m/z). L'information est en premier lieu qualitative car elle permet d'identifier les molécules présentes dans l'analyte. La sensibilité de la spectrométrie de masse peut aller jusqu'à la picomole. En outre, il peut arriver que le critère « masse moléculaire » ne soit pas suffisant pour discerner les molécules présentes. C'est le cas de protéines qui sortent au même ratio m/z (Wysocki, Resing, Zhang, & Cheng, 2005). Pour répondre à ce problème, il est possible de mettre des analyseurs MS en série. On parle de spectrométrie de masse à plusieurs dimensions. L'idée est d'obtenir une information structurale plus fine. Le premier MS sélectionne les ions avec un certain m/z et ces derniers, et seulement eux, repassent dans un autre analyseur MS pour une nouvelle séparation. On sépare donc un ion d'un mélange complexe sur lequel on poursuit l'analyse. On parle alors de MS-MS (ou MS^2) et rien n'empêche de continuer ce processus si le

besoin se présente, jusqu'à MS^n (Bedair & Sumner, 2008). Traditionnellement, on couple la chromatographie LC ou GC à la spectrométrie de masse; une technique qui a alors l'avantage de permettre la quantification et l'identification d'un très large nombre de métabolites parmi quoi protéines, lipides, sucres, acides nucléiques, acides aminés (Dettmer et al., 2007; Ding et al., 2007; Kanani, Chrysanthopoulos, & Klapa, 2008).

1.2.2.4 Application à notre cas d'étude

Le Tableau 1.2 résume les molécules analysées dans ce travail en donnant succinctement le critère physicochimique utilisé pour leur extraction, la méthode d'extraction et celle d'analyse.

Tableau 1.2 : Résumé des méthodes d'extraction et analyses des métabolites

Métabolite	Critère physique	Méthode d'extraction et analyse
Ion nitrate, ion phosphate	Anion	Broyage mécanique et extraction à l'acide trichloroacétique (TCA) 5% (v/v) puis Chromatographie liquide (Colonne : Dionex Échangeuse d'ions - Éluant : solution Na_2CO_3 / NaHCO_3 - Mesure : conductivité)
Nutriments : Ion ammonium	Substrat d'une réaction spécifique d'une enzyme	Broyage mécanique et extraction au TCA 5% puis neutralisation au 1M Tris-Hcl (pH = 7) puis mesure via réaction enzymatique (Glutamate dehydrogenase et mesure d'absorbance du NADPH résiduel à 340 nm)
Saccharides	Molécule organique neutre	Broyage mécanique et extraction à 80% éthanol puis passage dans résines AG1 et AG50. Éluion à l'eau distillée puis concentration par évaporation (speedvac) et passage en chromatographie liquide (colonne : Supelcogel Pb column (phase inverse) - éluant : eau distillée - mesure : indice réfraction)
Sucres phosphatés et acides organiques	Molécules très polaires	Broyage mécanique et extraction au méthanol 80% (v/v) + 0.1% HCOOH puis passage en chromatographie liquide (UPLC-MS ²) (colonne : Hypercarb (Graphite poreux) - éluant : (A) 20mM NH_4Ac (pH 7.5) et (B): 10 % (v/v) méthanol - mesure : absorbance)

1.3 Le modèle biologique des racines chevelues (« hairy roots »)

1.3.1 Établissement des cultures de racines chevelues

Agrobacterium rhizogenes (récemment reclassifiée comme *Rhizobium rhizogenes* (Young, Kuykendall, Martinez-Romero, Kerr, & Sawada, 2001)) est une bactérie tellurique à Gram négatif, responsable du développement d'une pathologie chez les végétaux appelée racines chevelues. Cette bactérie contient un plasmide Ri ("Root inducing") de haut poids moléculaire dont elle est capable d'en transférer un segment appelé ADN-T pour « ADN transféré » (Guillon, Trémouillaux-Guiller, Pati, Rideau, & Gantet, 2006; Tepfer, 1990). C'est ce segment qui, une fois transféré via une blessure sur divers tissus de plantes entières, s'intégrera au génome de la cellule végétale de manière définitive. En outre, ce ADN-T contient une série de gènes codant pour la production des hormones auxine et cytokinine (Cardarelli et al., 1987). Une fois cette séquence intégrée, la plante développera des racines chevelues au niveau de la blessure. Ces dernières correspondent à du matériel clonal puisque chaque racine résulte de la transformation d'une cellule. Elles pourront être cultivées indépendamment de la plante d'origine par la suite.

La compréhension de ce phénomène puissant de transgénése naturel de *A. rhizogenes* vers les plantes, couplée aux avancées en manipulation génétique a ouvert la voie à de nombreuses applications en génie génétique végétal (Tepfer, 1984). Ainsi, en insérant une séquence choisie d'ADN au sein du fragment ADN-T du plasmide Ri, il devient possible de générer des clones aux propriétés particulières (création d'une résistance aux insectes, d'une sur/sous expression de gènes propre à la lignée, ou encore d'une production de molécules d'intérêt pharmaceutique). En outre, cette puissante propriété de transgénése naturelle des agrobactéries a déjà été appliquée pour d'autres types cellulaires (levures, champignons, cellules humaines) (Tzvi Tzfira, Jianxiong Li, Benoît Lacroix, & Vitaly Citovsky, 2004).

1.3.2 Intérêts biologique et commercial

Les racines chevelues possèdent de multiples applications :

- La transformation avec *A. rhizogenes* mène à la génération d'un clone racinaire disposant d'une bonne stabilité génétique, d'une forte ramification, d'une perte du géotropisme et capable d'une croissance rapide dans un milieu synthétique sans hormones, Ces racines

représentent un outil intéressant pour l'étude et la compréhension du métabolisme végétal non photosynthétique (Doran, 1997; Z.-B. Hu & Du, 2006; Shanks & Morgan, 1999; Tepfer, 1990);

- Elles sont capables d'effectuer des étapes de bioconversion utiles à la phytoremédiation (dépollution des sols par les plantes) telles que démontrées pour le cas du 2,4-dichlorophénol (Agostini, Coniglio, Milrad, Tigier, & Giulietti, 2003) ou de métaux lourds comme l'uranium (Eapen, Suseelan, Tivarekar, Kotwal, & Mitra, 2003);
- Il est possible, grâce à *A. Rhizogenes* et aux connaissances actuelles en transgénèse, de modifier le niveau d'expression d'une enzyme ou d'insérer de nouveaux gènes pour la production d'une molécule d'intérêt (Tzvi Tzfira, Jianxiong Li, Beno t Lacroix, & Vitaly Citovsky, 2004);
- De plus, elles sont compétentes pour produire des métabolites secondaires spécifiques de la plante dont elles sont issues aux applications larges (agroalimentaire, thérapeutique ou cosmétique), avec un meilleur si ce n'est égal niveau de production que la plante intacte (Ermayanti, McComb, & O'Brien, 1994). Des travaux ont mis en avant l'utilisation d'une phase immiscible pour l'extraction en continu des métabolites secondaires (Tikhomiroff, Allais, Klvana, Hisiger, & Jolicoeur, 2002).
- De la même manière il est possible de faire produire des protéines d'intérêt via l'introduction d'un plasmide recombinant (Shanks & Morgan, 1999).
- Enfin, les racines transformées peut servir d'hôte à la production de propagules de champignons endomycorhiziens, des champignons inoffensifs qui aident les plantes à se développer dans des environnements pauvres et à se protéger des pathogènes (Jolicoeur, 1998)

Le Tableau 1.3 présente quelques exemples de molécules produites via des racines chevelues avec leurs applications respectives.

Tableau 1.3 : Métabolites produits par des racines chevelues et applications

Origine	Molécule	Application	Référence
<i>Hyoscyamus niger</i>	Scopolamine	Anticholinergique, traitement de la maladie de Parkinson	(Zhang et al., 2004)
<i>Rubia tinctorum</i>	Anthraquinone	Industrie pâtes et papiers, précurseurs d'anticancéreux	(Chang, Guo, Shen, Wang, & Zheng, 1998)
<i>Coleus forskohli</i>	Forskoline	Vasodilatateur, augmente la concentration de cAMP	(Sasaki et al., 1998)
<i>Arnebia ispidissima</i>	Shikonine	Colorant alimentaire, antiallergique, antibactérien	(Chaudhury & Pal, 2010)

1.3.3 Survol de l'exploitation industrielle

Une fois la culture et la production de métabolites d'intérêt en laboratoire démontrée, et ce de niveau satisfaisant, on voudra légitimement se diriger vers une production industrielle, à grande échelle. Pourtant, bien que le système biologique paraisse attractif au vu des qualités citées précédemment, de nombreuses limitations ont freiné, jusqu'à présent, le développement de procédés industriels (Srivastava & Srivastava, 2007) :

- l'hétérogénéité du tissu empêche un transfert d'oxygène et de nutriments efficace et mène à la création de zones nécrosées;
- un suivi difficile de l'avancement de la culture : biomasse, viabilité cellulaire, état métabolique, etc.;
- un manque de compétitivité due aux coûts élevés de fonctionnement en conditions stériles face à une culture de plantes entières, plus accessibles, bien que les serres cGMP lorsque requises sont également onéreuses.

Néanmoins de nombreux travaux de recherche ont été menées ces dernières décennies sur le développement de bioréacteurs pour la production de racines à grande échelle (Choi, Kim, & Paek, 2006; Srivastava & Srivastava, 2007; Weathers, Towler, & Xu, 2010) dont quelques exemples typiques sont présentés dans le Tableau 1.4. Des représentations schématiques des réacteurs sont données en Figure 1.17, Figure 1.18, Figure 1.19 et Figure 1.20.

Tableau 1.4 : Comparatif de réacteurs pour la culture de racines

Nom du réacteur et principe : (+) Avantages (–) Limitations
<p>Réacteur complètement mélangé (Réacteur à milieu liquide, avec agitateur mécanique et bullage)</p> <p>(+) Bon transfert de matière grâce à l'agitateur</p> <p>(–) Cisaillement important (abîmage des racines) formation de cals</p>
<p>Réacteur à "airlift" (Réacteur à milieu liquide, sans agitateur mécanique, avec bullage)</p> <p>(+) Cisaillement moins important qu'avec un agitateur mécanique</p> <p>(–) Transfert de matière (oxygène et nutriments) insuffisant pour des hautes densités de biomasse - Créations de zones mortes</p>
<p>Réacteur cylindre rotatif - « Rotating drum » (Réacteur à milieu liquide, tournant de 2 à 6 RPM)</p> <p>(+) Cisaillement moins important qu'avec un agitateur mécanique</p> <p>(+) Bonne homogénéisation</p> <p>(–) Transfert de matière (oxygène et nutriments) insuffisant pour des hautes densités de biomasse</p> <p>(–) Créations de zones mortes</p> <p>(–) Consommation énergétique importante pour un passage à échelle industrielle. Faible utilisation du volume.</p>
<p>Réacteur à bruine (mist) (création d'une bruine par mélange gaz/milieu liquide qui asperge les racines)</p> <p>(+) La composition du mélange gazeux est parfaitement contrôlée</p> <p>(+) Le transfert et renouvellement de l'oxygène et des nutriments est efficace (surface d'échange importante)</p> <p>(–) Le chargement initial des racines est manuel pour obtenir une répartition homogène de la biomasse.</p> <p>(–) Problèmes à très haute densité cellulaire.</p>

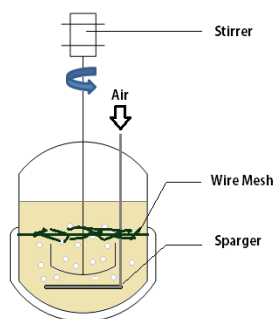


Figure 1.17 : Représentation schématique d'un réacteur complètement agité

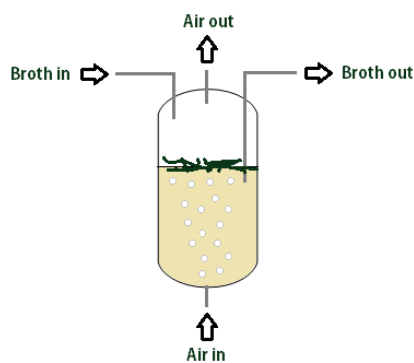


Figure 1.18 : Représentation schématique d'un réacteur à bullage (airlift)

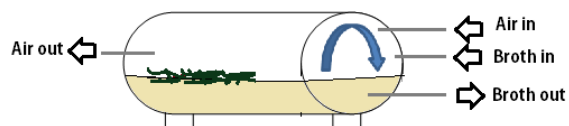


Figure 1.19 : Représentation schématique d'un réacteur cylindre rotatif.

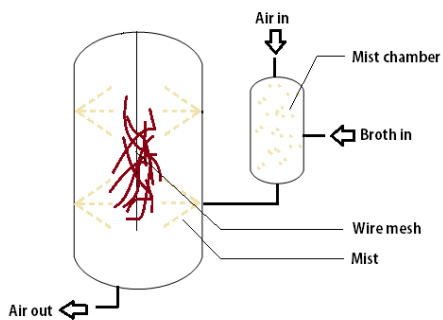


Figure 1.20 : Représentation schématique d'un réacteur à bruite

Le réacteur idéal permettrait :

- une bonne croissance des racines;
- un transfert adéquat en oxygène et nutriments;
- la possibilité de suivre en ligne la croissance et ce, de manière non invasive;
- l'assurance que l'intégrité de la biomasse soit préservée jusqu'à la fin de culture;
- la récupération facile des métabolites d'intérêt (métabolites secondaires, protéines recombinantes etc.).

A ce jour, seule l'entreprise suisse Rootec¹ a fait le pas de manière industrielle en utilisant des réacteurs à bruine permettant la récupération des métabolites sécrétés directement via la bruine condensée en bas de colonne. Elle produit à grande échelle des racines de *Camphotheca* fournissant la camphothecine, molécule à portée anti-tumorale; premier pas qui laisse donc croire à une utilisation plus étendue prochaine de ce type de plateforme de production.

¹ <http://www.rootec.com/>

Chapitre 2 ANALYZING THE EFFECT OF DECREASING CYTOSOLIC TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE ON SOLANUM TUBEROSUM HAIRY ROOTS CELLS USING A KINETIC-METABOLIC MODEL

Ce chapitre présente un manuscrit scientifique, objet d'une soumission en date du 11 juin 2012 à la revue *Biotechnology and Bioengineering*. Le manuscrit présente d'une part les méthodes d'analyses chimiques employées et d'autre part le développement du modèle cinétique (structure, cinétiques, conditions initiales, identification). Il y présente également les résultats obtenus via les mesures et les simulations dynamiques. Une discussion est également présentée de même que des conclusions sur l'effet de la diminution de la cTPI sur le métabolisme végétal.

2.1 Résumé

Un modèle cinétique métabolique, appliqué à des racines chevelues de *Solanum tuberosum* est présenté en vue de comprendre l'impact d'une diminution de 90% du niveau d'Expression de la triosephosphate isomerase (cTPI, EC 5.3.1.1) sur le métabolisme végétal. Le modèle prend en compte les voies majeures du métabolisme telles que la glycolyse, la voie des pentoses phosphate, le cycle de Krebs and certaines voies anabolique de synthèse des lipides, acides nucléiques, acides aminés et les hexoses structuraux. Des mesures ont été effectués lors d'expériences en erlenmeyers sur 6 nutriments extracellulaires (saccharose, fructose, glucose, ammonium, nitrate, phosphate inorganique) et 15 intermédiaires intracellulaires parmi quoi sucres phosphatés (G6P, F6P, R5P, E4P), acides organiques (PYR, aKG, SUCC, FUM, MAL) et les 6 nutriments. L'utilisation couplée du modèle et des mesures expérimentales on permit de montrer que le métabolisme végétal redistribuait les flux pour compenser la diminution en cTPI. Les racines cTPI antisens font preuve d'échanges accrus entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphate, un taux de respiration et de croissance plus élevés et des flux du bas de la glycolyse et du cycle de Krebs diminués.

2.2 Authors

Alexandre Valancin¹, Balasubrahmanyam Srinivasan¹, Jean Rivoal², Mario Jolicoeur^{1,*}

¹ Canada Research Chair in Applied Metabolic Engineering, Bio-P² Research Unit, Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montreal, P.O. Box 6079, Station Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3A7

² IRBV, Université de Montréal, 4101 rue Sherbrooke est, Montréal, QC, H1X 2B2, Canada

* Corresponding author: mario.jolicoeur@polymtl.ca

2.3 Keywords

Dynamic model, metabolic modeling, plant cell metabolism, hairy roots

2.4 Running title

Study of the effect of decreasing cytosolic triose-P isomerase in roots via a kinetic-metabolic model

2.5 Abstract

A kinetic-metabolic model of *Solanum tuberosum* hairy roots is presented in the interest of understanding the effect on the plant cell metabolism of a 90% decrease in cytosolic triosephosphate isomerase (cTPI, EC 5.3.1.1) expression by antisense RNA. The model considers major metabolic pathways including glycolysis, pentose phosphate pathway and TCA cycle, as well as anabolic reactions leading to lipids, nucleic acids, amino acids and structural hexoses synthesis. Measurements were taken from shake flask cultures for 6 extracellular nutrients (sucrose, fructose, glucose, ammonia, nitrate, inorganic phosphate) and 15 intracellular compounds including sugar phosphates (G6P, F6P, R5P, E4P) and organic acids (PYR, aKG, SUCC, FUM, MAL) and the 6 nutrients. From model simulations and experimental data it can be noted that plant cell metabolism redistributes metabolic fluxes to compensate for the cTPI decrease, leading to modifications in metabolites levels. Antisense roots showed increased exchanges between the pentose phosphate pathway and the glycolysis, an increased oxygen uptake and growth rate.

2.6 Introduction

Among the various cell platforms used in biotechnology, *in vitro* plant cell and hairy roots are gaining in interest because of their significant advantages over the mammalian cell platform. Plant cells do not promote the development of human pathogens, they grow in low cost chemically defined culture media, are capable of complex protein glycosylation (Ma, Drake, & Christou, 2003), exhibit a reliable genetic stability, and multiple applications as showed by (Doran, 1997; Z.-B. Hu & Du, 2006; Shanks & Morgan, 1999; Tepfer, 1990) in the case of hairy roots. However, yields still have to be enhanced to meet economical viability. The key nutrients affecting culture performance have been identified (M. Cloutier, Bouchard-Marchand, Perrier, & Jolicoeur, 2008; L. Lamboursain & Jolicoeur, 2005), and it has been demonstrated that culture management can be improved using an *in silico* model describing cell behaviour (Mathieu Cloutier et al., 2009). Nevertheless, developments in metabolic engineering allowing to deeply modify a plant cell catalytic capacity may clearly benefit from having a better description of the regulation of the metabolic network.

The principal metabolic pathway that has been targeted for enhancing the carbon flow is the glycolysis (Dai et al., 1999; Mustroph, Albrecht, Hajirezaei, Grimm, & Biemelt, 2005; Vonschaewen, Stitt, Schmidt, Sonnewald, & Willmitzer, 1990). However, there were very little successful attempts, probably due to metabolic flexibility especially for the glycolysis (W. C. Plaxton, 1996, 1999; William C. Plaxton & Podestá, 2006). TPI is a glycolytic enzyme that catalyzes the isomerisation of dihydroxyacetone-phosphate (DHAP) in glyceraldehyde-3-phosphate (G3P). In plant cells, two isoforms (cytosolic and plastidic) of triosephosphate isomerase TPI are present because the glycolysis is taking place in both compartments (W. C. Plaxton, 1996). The cytosolic isoform is predominant in all plant tissues (Sonia Dorion, Parveen, Jeukens, Matton, & Rivoal, 2005). This reaction constitutes a crucial step as the trioses G3P and DHAP are at the branch point between the glycerolipids, the glycolysis and the pentose phosphate pathway (W. C. Plaxton, 1996). Interestingly, in the case of human metabolism, a TPI deficiency of genetic origin causes DHAP accumulation, which consequently leads to neurodegenerative troubles and ultimately death (Olah et al., 2002). Also, (Chen & Thelen, 2010) showed that a pTPI deficiency induces the accumulation of DHAP and methylglyoxal, a by-

product of DHAP, and lipids profile variations. Recent studies (S. Dorion et al., 2012) revealed that a cTPI decrease causes the alteration of carbon distribution in primary metabolism, a greater O₂ uptake and an increased lipid synthesis capacity.

In that context, we have further investigated the effect of a 90% decrease in cTPI expression level (by comparison to a control) on the metabolism of heterophic potato hairy roots, adapting a kinetic modeling approach previously developed (M. Cloutier et al., 2007). The use of a kinetic-metabolic model allows to perform metabolic flux analysis (MFA) in non steady-state conditions, which is the case for plant cells because of their metabolic plasticity (storage processes, pathway control) (Libourel & Shachar-Hill, 2008). The interest of using a kinetic model relies on its capacity to simulate experimental data, as well as to lead to the characterization of a biosystem with kinetic parameters values (V_{max} and K_m) and metabolic fluxes rates. It is understood that a model can only partially describe a cell metabolic network, having some of the biochemical reactions that are lumped together; either because of our lack of knowledge or for simplification purposes. We have previously demonstrated the reliability of such models at describing (M. Cloutier et al., 2007; Leduc et al., 2006) and even predicting plant cells and hairy roots behaviour. In this work, we adapted and expanded our model to *Solanum tuberosum* hairy roots introducing measurements of 6 extracellular nutrients (sucrose, fructose, glucose, ammonia, nitrate, inorganic phosphate) and 15 intracellular metabolites and nutrients, including sugar phosphates (G6P, F6P, R5P, E4P) and organic acids (PYR, aKG, SUCC, FUM, MAL). Therefore, the purpose of this work was to characterize, using an *in silico* platform, the metabolic behaviour of a transgenic hairy root line with a decreased expression of cytosolic triosephosphate isomerase (cTPI, EC 5.3.1.1) generated by an antisense RNA, compared to a control clone.

2.7 Materials and Methods

2.7.1 Plant material and hairy root cultures

Two hairy roots transgenic clones produced by transformation with *Agrobacterium rhizogenes* were selected. The antisense clone AS1.8 (S. Dorion et al., 2012) carries an antisense construct for cTPI under the control of the CaMV35S promoter in the binary vector pGA643. The control clone C2.5 also contains the empty pGA643 plasmid. Hairy roots clones were cultivated for

approximately 3 weeks on Petri plates on solid MS medium supplemented at 3% sucrose. Two independent batch experiments were performed at different times as replicates. For each experiment, 250 mL flasks containing 30 mL of liquid MS medium supplemented with 3% sucrose were inoculated with 0.200 ± 0.017 g FW. Roots were cultivated on an orbital shaker at 140 rpm at 22°C for around 7 d. Each day, flasks were sampled for each clone and treated as technical replicates. Liquid medium volume was measured and liquid samples were kept for further analysis at -80°C. The roots were washed twice with 100 mL distilled water, then rapidly and gently blotted between Kimwipes sheets (Kimberly-Clark, Montreal, Québec, Canada) as previously described (Leduc et al., 2006). The fresh weight was then measured and the roots were wrapped in aluminum foil and transferred in liquid nitrogen to quench metabolism.

2.7.2 Metabolites analysis

2.7.2.1 Sugars (Sucrose, Glucose, Fructose)

The quantification of intracellular sugars was performed as follows. Root material was extracted in 80% (v/v) ethanol and fractionated on AG1 and AG50 resins (Biorad, Mississauga, ON) into neutral, anionic and cationic fractions as previously described (Rivoal & Hanson, 1993). Aliquots of the neutral fraction were evaporated to dryness. For extracellular sugars, medium aliquots of 0.5 mL were processed on ion exchange resins as described above. The analysis was made on a Waters HPLC system controlled by the Empower Pro software and equipped with a 600 controller, a 717 Plus refrigerated automatic sample injector and a 2414 Refractive Index. The neutral fraction from each sample was used for the determination of carbohydrates using a Supelcogel Pb column (300 mm x 4.6 mm) equipped with a 50 mm x 4.6 mm Supelguard Pb precolumn. The column was run at 85°C at a flow rate of 1 mL min^{-1} with H_2O as solvent (S. Dorion et al., 2012).

2.7.2.2 Nutrients : anions (NO_3^- , H_2PO_4^-) and cation (NH_4^+)

The extraction procedure was as follows. The sample was grinded in 3 x 1 mL TCA 10% (w/v) at 4°C. The mixture was then centrifuged for 10 min at 4°C and 16,000 g and the supernatant was kept at -80°C for further analysis. Anions (H_2PO_4^- , NO_3^-) were analyzed using a Dionex ion chromatography system (Dionex Canada Ltd., Oakville, Canada) controlled by the Dionex

Chromeleon software for anions and equipped with an IP20 isocratic pump, an AS-3500 automated sampler and a CD20 pulsed electrochemical detector in the conductivity mode. Anions were separated using a 4 x 250 mm IONPAC AS14A-SC analytical column, an IONPACAG14A-SC guard column and an ASRS-1 anion self-regeneration suppressor to improve the signal-to-noise ratio. The mobile phase consisted of 2 mM Na₂CO₃ / 1 mM NaHCO₃ solution used at a 1.0 mL min⁻¹ flow rate. Both intracellular supernatants and liquid media were passed through 0.45 µm nitrocellulose filter before analysis. Twenty µL of the sample was injected for anion analysis. For NH₄⁺, both intracellular and extracellular solutions were buffered with a 1M Tris-HCl pH 7 solution and analyzed via an enzymatic kit (Sigma, kit #AA0100).

2.7.2.3 Sugar phosphates and organic acids

The extraction procedure was performed as follows. 0.7 mL of (MeOH 80% + HCOOH 0.1%) (v/v) was added to the frozen sample in a cold mortar (VWR Canlab, Oakville, Ontario, Canada) kept on ice. The mix was vigorously grinded with a pestle then transferred in a 1.5 mL vial. Both pestle and mortar were washed twice with 0.2 mL (MeOH 80% - HCOOH 0.1%) (v/v) and the wash solutions were added to the vial. The total extract was sonicated at 4°C for 30 min. The vials were then centrifuged at 4°C and 15,000 g for 10 min. Sugar phosphates and organic acids were analyzed on a UPLC-MS/MS (Agilent, Quebec, Canada), equipped with a 1290 infinity binary pump, an autosampler, a column controller and a 6460A triple quad mass spectrometer. Extracts were filtered through 0.22 µm PTFE filters (Millipore, Ontario, Canada) before being passed on a Hypercarb column (100*2.1 mm, 5 µm) and a Hypercarb pre-column (2.1*10, 5 µm) (Thermo Fisher, Ontario, Canada). The mobile phase consisted of A: 20mM ammonium acetate at pH 7.5 and B: 10 % (v/v) methanol in water used at a 0.3 mL.min⁻¹ flow rate. The mobile phase gradient profile was: 0-5 min at 10% A, 5-10 min at linear gradient from 10 to 20% A, 10-20 min at linear gradient from 20 to 100% A, 20-30 min at 100% A, 30-32 min at linear gradient from 100 to 10% A and 32-40 min at 10% A. The negative electrospray ionization model was selected for the analysis with Agilent Jet Stream source. Spiking samples were done with a recovery rate higher than 80% and metabolite contents were corrected for recovery.

2.7.2.4 Respiration assays

Respirometric assays were performed at days 3 and 6 using a lab-built respirometer developed by (Laurence Lamboursain, St-Onge, & Jolicoeur, 2002) with 100 mg FW roots and 5 mL MS medium. Oxygen uptake rates (OUR) were obtained measuring the slope of the linear oxygen decrease, considering an oxygen solubility at 25 °C in MS media of 7.92 mg L⁻¹ as measured by (Hvoslef-Eide & Preil, 2005).

2.7.3 Kinetic modeling

2.7.3.1 Model structure

A kinetic model (see Figure 2.1 for a representation of the metabolic map) based on mass balances implying 31 reactions (Tableau 2.2) and 40 metabolites was develop to represent the most important pathways of the heterotrophic plant primary metabolism. Major nutrients uptakes were first considered (R1 to R7). For glycolysis (R8 to R13), as measurements of trioses intermediates like GAP, DHAP and the downstream metabolites (3PG, 2PG, PEP) were not available; a pool named T3P was considered (Figure 2.1). The PPP was also considered (R14 and R15) with R5P accounting for the 5-carbon pool (ribulose, ribose and xylose) and E4P. Even if the PPP is reduced to a few reactions, it helps understanding the carbon flows between glycolysis and PPP. This pathway is also important as it produces precursors for nucleic acids (NUC) and certain amino acids (AA). The TCA cycle is also considered (R17 to R22) going from ACOA to OXA, which is responsible for the production of reducing power (NADH, FADH₂). An important anaplerotic reaction is also introduced (R23) in order to represent the resupply of the TCA cycle in OXA. Finally, the main anabolic reactions were represented for AA (R28), STA (R30), LIP, (R31), STH, (R29), NUC (R27). For AA synthesis, the nitrate reduction (R24) and a global reaction with the main carbon skeleton precursors (E4P, T3P, PYR, aKG, OXA) and NH₄⁺ as the nitrogen source were considered. As explained by (J. Schwender, 2008), a biomass equation is needed to avoid metabolite accumulation in the model and explain the nutrients use for biomass synthesis. An approximation of the biomass composition was then drawn, based on measurements made by (Sriram, González-Rivera, & Shanks, 2006) for *Catharanthus Roseus*. To obtain the stoichiometry of cell building blocks reactions, molecular weights (see Tableau 2.1) of

the units (glucose, nucleotide, amino acids etc.) composing the macromolecules were used with the same type of procedure proposed for CHO cells by (Nolan & Lee, 2011). The proportion of each base (AMP, TMP, GMP, CMP) for nucleic acids was obtained via the *S. tuberosum* genome given on the *Sol Genomics Network* database. Finally, a dry-to-fresh weight ratio of ten was used, based on not shown data. The model consists of a set of ordinary differential equations (ODE) representing mass balances on each component of the biosystem. Equation (1) gives the matrix representation of the system in moles.

$$\begin{cases} \frac{dn}{dt} = N^T r X(t) \\ n(0) = n_0 \end{cases} \quad (1)$$

The stoichiometric matrix N includes the stoichiometric coefficients of the R reactions. The vector of kinetics rates r was assumed to be irreversible Michaelis-Menten mechanism. The considered kinetic rates are given in Tableau 2.3. X is the biomass fresh weight. For the growth rate, a multiple Monod for G6P, PYR and R5P was considered, meaning that each of the concentrations affects the specific growth rate μ . As the kinetics rates are in $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{FW.d}^{-1}$, the mass balance in g FW for hairy roots biomass is given in equation (2):

$$\frac{dX}{dt} = r_{26} \underbrace{\frac{FW}{DW}}_{\mu} M_X X \quad (2)$$

where r_{26} is the biomass synthesis rate in $\text{mol.g}^{-1} \text{FW.d}^{-1}$, $\frac{FW}{DW}$ is the fresh-to-dry weight ratio assumed to be 10, M_X is the biomass molecular weight (g DW.mol^{-1}) approximated as described above.

Tableau 2.1 : Molecular weights of macromolecules

Macromolecule composition	M (g.mol ⁻¹)
LIP : C ₁₈ triglycerid	890.0
STH (β -glucan/cellulose) and STA : D-glucose polymer	162.1
STH (hemicellulose) : 50% (mol/mol) glucose + 50% xylose	165.1
AA : Average amino acid	110.0
NUC : Nucleotides polymer	317.3

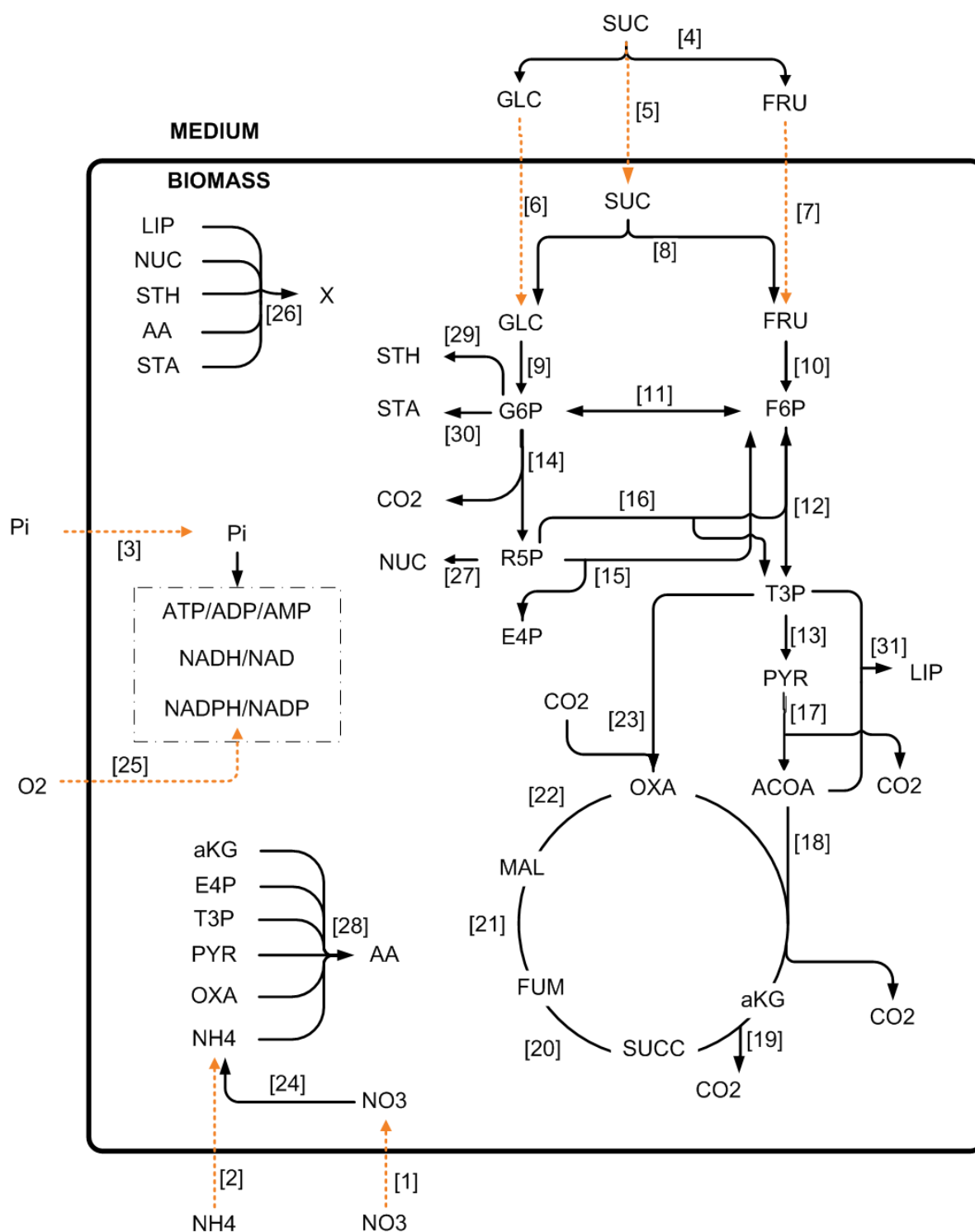


Figure 2.1: Metabolic network. Reaction numbers are in brackets. Orange arrows represent nutrients uptake. See Table 2 for reactions details.

Tableau 2.2 : Reactions considered in the kinetic model

Pathway	R	Equation
Nutrients	1	$E_{NO3} + ATP = NO3 + ADP + Pi$
	2	$E_{NH4} + ATP = NH4 + ADP + Pi$
	3	$E_{Pi} + ATP = ADP + 2 Pi$
	4	$E_{SUC} = E_{GLC} + E_{FRU}$
	5	$E_{SUC} + ATP = SUC + ADP + Pi$
	6	$E_{GLC} + ATP = GLC + ADP + Pi$
	7	$E_{FRU} + ATP = FRU + ADP + Pi$
	8	$SUC = FRU + GLC$
Glycolysis	9	$GLC + ATP = G6P + ADP$
	10	$FRU + ATP = F6P + ADP$
	11	$G6P = F6P$
	12	$F6P + ATP = ADP + 2 T3P$
	13	$T3P + NAD + 2 ADP = PYR + NADH + 2 ATP + H^+$
PPP	14	$G6P + 2 NADP = R5P + 2 NADPH + CO2 + 2 H^+$
	15	$2 R5P = F6P + E4P$
	16	$3 R5P = 2 F6P + T3P$
	17	$PYR + NAD + CoaSH = CO2 + NADH + ACoA$
TCA cycle	18	$AcoA + OXA + NAD + H2O = aKG + CoAsH + NADH + CO2$
	19	$aKG + NAD + ADP + Pi = SUCC + NADH + ATP + CO2$
	20	$SUCC + FAD = FUM + FADH2$
	21	$FUM + H2O = MAL$
	22	$MAL + NAD = OXA + NADH + H^+$
	23	$T3P + CO2 + ATP = OXA + Pi + ADP + H2O$
anaplerotic TCA	24	$NO3 + NADH + 3 NADPH = NH4 + NAD + 3 NADP$
Nitrate	25	$NADH + FADH2 + E_{O2} + 5 ADP + 5 Pi = NAD + FAD + 5 ATP$
Oxydative	26	$1.018 STH + 0.020 LIP + 0.048 NUC + 0.042 STA + 0.085 AA = X$
Biomass	27	$R5P + 4.24 ATP + 1.62 AA + 1.62 NH4 + 0.62 CO2 = NUC + 1.62 GLU + PPi + 3.24 ADP + 3.24 Pi + 0.62 FUM + AMP$
NUC synthesis	28	$0,05 E4P + 0,25 T3P + 0,21 PYR + 0,34 ATP + 0,3 aKG + 0,29 OXA + 0,24 NADH + 0,30 NADPH + NH4 = AA + 0,84 Pi + 0,34 ADP + 0,63 NAD + 0,29 NADP$
AA synthesis	29	$G6P + 2 ATP + NADPH = STH + 2 ADP + NADP + Pi + Ppi$
STH synth.	30	$G6P + ATP = STA + ADP + Ppi$
STA synth.	31	$27 ACOA + T3P + 21 ATP + 45 NADPH = LIP + 21 ADP + 21 Pi + 45 NADP$
LIP synthesis		

Tableau 2.3: Kinetics rates expressions

R	Kinetics	R	Kinetics
1	$r_1 = V_{MAX1}$	17	$r_{17} = V_{MAX17} \frac{PYR}{PYR + K_{M17}}$
2	$r_2 = V_{MAX2}$	18	$r_{18} = V_{MAX18} \frac{ACOA}{ACOA + K_{M18}}$
3	$r_3 = V_{MAX3}$	19	$r_{19} = V_{MAX19} \frac{aKG}{aKG + K_{M19}}$
4	$r_4 = V_{MAX4} \frac{E_SUC}{E_SUC + K_{M4}}$	20	$r_{20} = V_{MAX20} \frac{SUCC}{SUCC + K_{M20}}$
5	$r_5 = V_{MAX5}$	21	$r_{21} = V_{MAX21} \frac{FUM}{FUM + K_{M21}}$
6	$r_6 = V_{MAX6}$	22	$r_{22} = V_{MAX22} \frac{MAL}{MAL + K_{M22}}$
7	$r_7 = V_{MAX7}$	23	$r_{23} = V_{MAX23} \frac{T3P}{T3P + K_{M23} \left(1 + \frac{OXA}{K'_{M23}}\right)}$
8	$r_8 = V_{MAX8} \frac{SUC}{SUC + K_{M8}}$	24	$r_{24} = V_{MAX24} \frac{NO3}{NO3 + K_{M24}}$
9	$r_9 = V_{MAX9} \frac{GLC}{GLC + K_{M9}}$	25	$r_{25} = V_{MAX25}$
10	$r_{10} = V_{MAX10} \frac{FRU}{FRU + K_{M10}}$	26	$r_{26} = V_{MAX26} \left(\frac{G6P}{G6P + K_{M26}} \right)^4 \frac{PYR}{PYR + K_{M26}} \frac{R5P}{R5P + K_{M26}}$
11	$r_{11} = V_{MAX11} \frac{G6P}{G6P + K_{M11}}$	27	$r_{27} = V_{MAX27}$
12	$r_{12} = V_{MAX12} \frac{F6P}{F6P + K_{M12}}$	28	$r_{28} = V_{MAX28} \frac{NH_4}{NH_4 + K_{M28}}$
13	$r_{13} = V_{MAX13} \frac{T3P}{T3P + K_{M13}}$	29	$r_{29} = V_{MAX29}$
14	$r_{14} = V_{MAX14} \frac{G6P}{G6P + K_{M14}}$	30	$r_{30} = V_{MAX30}$
15	$r_{15} = V_{MAX15} \frac{R5P}{R5P + K_{M15}}$	31	$r_{31} = V_{MAX31}$
16	$r_{16} = V_{MAX16} \frac{R5P}{R5P + K_{M16}}$		

2.7.4 Parameter identification

The first assumption was that K_m values remained the same between the two clones; the decrease in cTPI having no effect of the enzyme-substrate chemical affinities. Furthermore, this assumption simplifies the problem of parameters identification step due to an important mathematical correlation between V_{max} and K_m (Baltes, Schneider, Sturm, & Reuss, 1994; Petersen, Gernaey, & Vanrolleghem, 2001). A minimization routine was applied to the objective function residual sum-of-squares to identify the θ vector of V_{max} parameters given in equation (3).

$$J(\theta) = \sum_{c_j} \sum_{i=1}^8 \left(\hat{c}_j(t_i, \theta) - c_{exp,j}(t_i) \right)^2 \quad (3)$$

With t_i as the sampling points, c_{exp} the experimental concentrations, and $\hat{c}(t_i, \theta)$ the simulated concentrations. The local confidence intervals for the estimated parameters were assessed with the Fisher Information Matrix (FIM) (Walter & Pronzato, 1994), known as the inverse of the parameter estimation error covariance matrix. With this technique, a rapid assessment of the errors made on the parameters is provided (Ljung, 2001). We approximated numerically the FIM by the hessian matrix. Finally to avoid indeterminations, constraints and assumed values were considered for certain parameter identifications as V_{max} (4) (sucrose hydrolysis) and V_{max} (16) (flux coming from the PPP and going back to the glycolysis) that were respectively set at 300 and 3 $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{FW.d}^{-1}$ and non-measured metabolites (as NUC, STA, AA, LIP, STH, T3P and ACOA) related parameters that were identified under the constraint of a steady state for these concentrations (see Tableau 2.4 for the initial values of these metabolites). The V_{max} values are given in Tableau 2.6.

Tableau 2.4 : Initial conditions for the non-measured metabolites

Metabolite	Initial value ($\mu\text{mol.gFW}^{-1}$)
T3P	0.200
ACOA	0.100
OXA	0.100
NAD	0.010
NADH	0.010
NUC	16.000
AA	30.000
STH	400.00
STA	10.000
LIP	25.000
CO2	10.000

Tableau 2.5 : Vmax estimated in $\mu\text{mol.g}^{-1}$ FW (with 95 % confidence intervals). Assumed values of K_m (in $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (for R1 to R7) then $\mu\text{mol.g}^{-1}$ FW) are also given.

	Control			cTPI antisense			K_m
1	71.50	\pm	31.39	63.96	\pm	17.31	-
2	71.93	\pm	33.10	83.60	\pm	21.96	-
3	5.00	\pm	0.87	6.79	\pm	1.71	-
4	300.00	\pm	0.00	300.00	\pm	0.00	9000.000
5	107.40	\pm	28.22	133.10	\pm	58.65	-
6	136.30	\pm	76.89	105.69	\pm	45.96	-
7	81.47	\pm	95.33	59.16	\pm	53.51	-
8	107.15	\pm	1.72	131.28	\pm	1.47	0.100
9	239.51	\pm	2.47	239.33	\pm	2.14	0.700
10	187.68	\pm	2.45	189.62	\pm	2.11	0.200
11	73.76	\pm	2.80	58.69	\pm	1.50	0.010
12	283.83	\pm	2.38	268.64	\pm	1.23	0.005
13	446.20	\pm	12.61	421.28	\pm	11.30	0.010
14	23.57	\pm	2.60	24.58	\pm	1.39	0.015
15	6.30	\pm	1.10	6.24	\pm	0.60	-
16	3.00		-	3.00		-	0.010
17	425.42	\pm	13.80	407.77	\pm	10.90	0.001
18	714.32	\pm	27.41	647.02	\pm	18.66	0.100
19	325.34	\pm	16.40	293.00	\pm	8.33	0.010
20	351.37	\pm	19.94	314.91	\pm	13.24	0.005
21	336.20	\pm	20.98	312.71	\pm	14.93	0.001
22	324.43	\pm	21.98	293.73	\pm	15.43	0.010
23	226.90	\pm	35.11	223.27	\pm	34.50	0.100
24	90.00	\pm	5.43	70.98	\pm	4.57	16.000
25	744		-	951		-	-
26	618	\pm	0.14	1295	\pm	0.22	0.150
27	5.10		-	6.00		-	-
28	124.23	\pm	5.69	124.75	\pm	5.10	0.010
29	135.00		-	145.00		-	-
30	4.50		-	5.50		-	-

31	5.00	-	6.00	-	-
----	------	---	------	---	---

2.8 Results and Discussion

2.8.1 The decrease of cTPI affects primary metabolism intermediates concentrations

Both root clones, the cTPI antisense and the control, exhibited exponential growth behaviour (Figure 2.2). However, the cTPI antisense root culture showed a specific growth rate that was 2.5 ± 0.2 fold higher than for the control culture, with $0.284 \pm 0.021 \text{ d}^{-1}$ ($R^2 = 0.99$) and $0.111 \pm 0.007 \text{ d}^{-1}$ ($R^2 = 0.97$) respectively. After 6.2 days, the antisense root line culture led to a higher final root mass of $0.661 \pm 0.148 \text{ g FW}$ compared to $0.454 \pm 0.047 \text{ g FW}$ for the control. (S. Dorion et al., 2012) reported that TPI manipulation did not have a marked effect on growth, it should be pointed out that these observations were made on roots grown in flasks resupplied with MS medium 2 d before harvest. The roots used in the present study were grown for 6.2 d without medium resupply. These growth differences between the two studies may explain the differences observed for growth and some metabolites (see below). Interestingly, the antisense culture presented a lag phase for around two days, prior to entering exponential growth. No plateau phase could be observed for the culture duration (6.2 days), either for the cTPI antisense and the control culture, with major nutrients being only partially consumed (i.e. NO_3^- , NH_4^+ , H_2PO_4^- , SUC, GLC, FRU) (Figure 2.2). The medium sucrose was hydrolyzed to glucose and fructose by cell-wall invertases (Krishnan, Blanchette, & Okita, 1985), and the net extracellular glucose and fructose concentrations both continuously increased along with culture duration. Although there was a tendency of higher uptake rates of NH_4^+ and Pi in the cTPI antisense culture, differences with control culture were not statistically significant. The concentrations in NO_3^- and Pi were higher in the cTPI antisense while NH_4^+ concentration was lower in the control. Except for fructose, all other measured intracellular concentrations in major nutrients evolved differently in the cTPI antisense compared to the control, with time (Figure 2.2). Sucrose accumulated at a higher level in the antisense clone (~ 12 vs. $\sim 10 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ FW}$ by the end of the culture), and glucose accumulation was lower than for the control (~ 40 vs. $\sim 19 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ FW}$ at day 6), while there was no difference for fructose ($\sim 12 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1} \text{ FW}$ at day 6). The ranges of concentrations for

extracellular and intracellular major nutrients and sugars were consistent with other studies on hairy roots for various species (M. Cloutier et al., 2007; S. Dorion et al., 2012). Interestingly, although we observed differences in major nutrients and metabolites intracellular concentrations, global trends with time were similar in both cultures. While Pi concentration increased all along the culture, sucrose concentration reached a plateau at day 4, and NO_3^- reached a maximum at 2.5 d, then decreased and reached a plateau at day 4. Moreover, no significant differences were observed for the concentrations in G6P and F6P, as well as for the intermediates of the PPP (R5P and E4P) (see Figure 2.3). For the final steps of glycolysis, we observed that PYR concentration was significantly lower by $51 \pm 18 \%$ in the cTPI antisense clone compared to the control by the end of the culture. The TCA cycle intermediates MAL and FUM were also significantly lower in the antisense clone by respectively $55 \pm 9 \%$ and $59 \pm 10 \%$ at day 6. Nevertheless, SUCC and AKG concentrations were not statistically different between the two clones. Finally, the roots specific oxygen uptake rate was measured at day 3 and 6 and antisense clone revealed higher rates by $29 \pm 11\%$ than the control (Tableau 2.5).

Tableau 2.6 : Oxygen specific uptake rate qO_2 in $\mu\text{mol gFW}^{-1} \text{d}^{-1}$ ($n = 5$). Values are given with 95% confidence intervals

	Control	cTPI antisense
day 3	491 ± 48	615 ± 68
day 6	997 ± 73	1287 ± 84

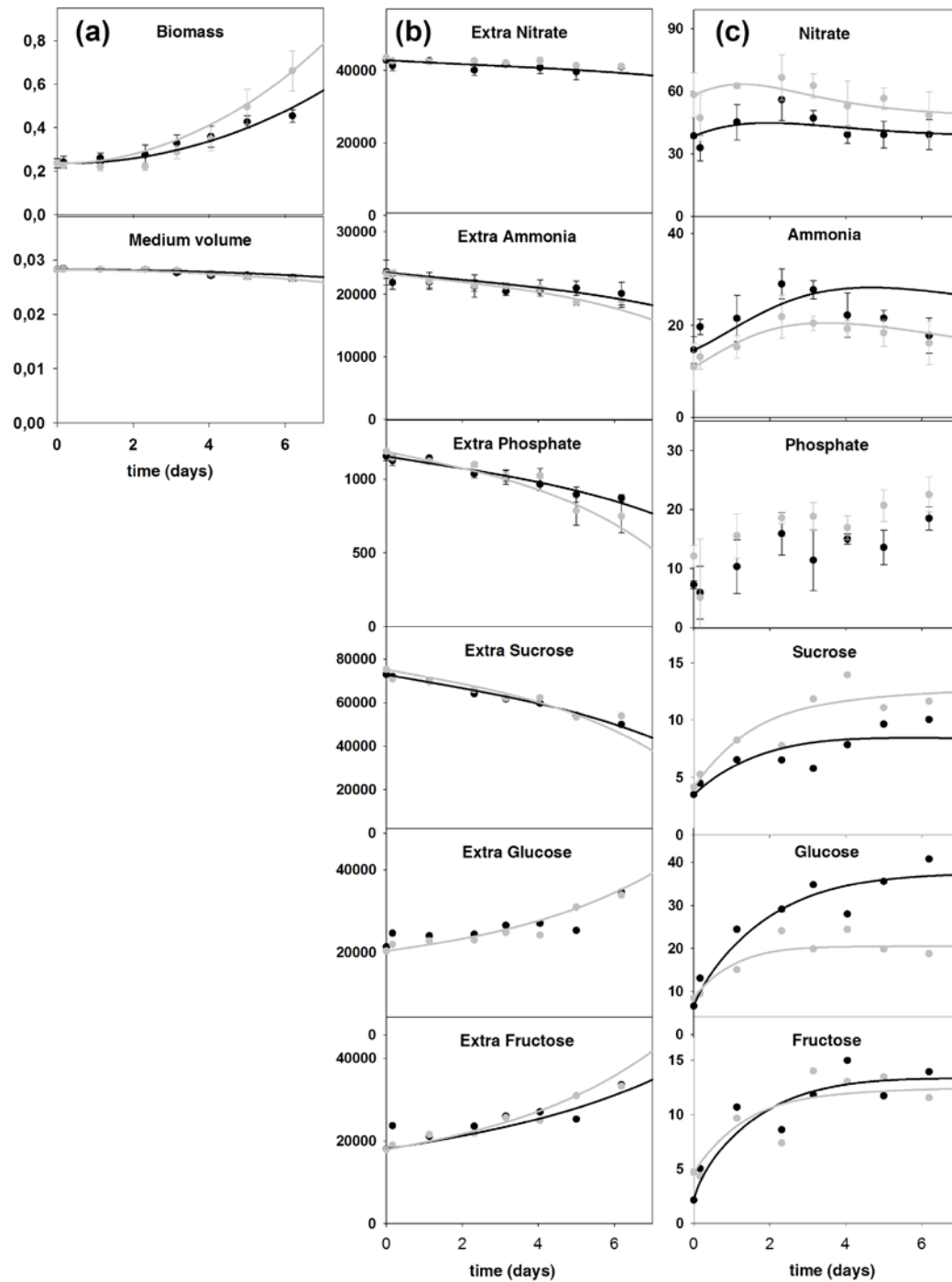


Figure 2.2 : Simulation and experimental data for (a) biomass (gFW) and medium volume ($n = 10$) (L), (b) extracellular nutrients ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) ($n = 3$) and (c) intracellular nutrient ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ FW) ($n = 3$). Control in black, cTPI antisense in grey. Error bars represent

2.8.2 Effect of a decrease in cTPI on metabolism dynamics as revealed from *in silico* model simulations

This section focuses on the use of the model as an *in silico* platform to further characterize the effects of cTPI antisense on root cells metabolism, beyond the primary analysis of experimental data discussed above. Model simulations of root cultures are presented together with experimental data in Figure 2.2 and Figure 2.3. Each biochemical reaction considered by the model is described kinetically with V_{\max} and K_m parameters. We thus have access to an estimate of effective fluxes rates with time ($r(t)$), as well as apparent maximal activity (V_{\max}) and substrate affinity (K_m). Such model can thus reveal valuable insights on both cell metabolic state and capacity. In this work, only V_{\max} values were modified in order to describe the control of the cTPI antisense root culture. Model kinetic parameters are given in Tableau 2.6 (V_{\max} and K_m) with their respective 95% confidence intervals (calculated as explained in the Materials and Methods section). As shown in Tableau 2.6, V_{\max} values for the nutrients uptake (R1 to R8) were not significantly different. The uncertainty on the sucrose hydrolysis coupled to the respective uptakes of the three sugars led to important confidence intervals. Nevertheless as the extracellular concentrations were all similar between the two clones, one can assume that no significant change occurred on nutrients uptakes due to the cTPI decrease. The computed reaction fluxes (Figure 2.4) as well as parameters estimation (Tableau 2.6) revealed that the flux for the phosphorylation of GLC and FRU (R9 and R10) were similar, meaning that the cTPI decrease did not affect hexose phosphorylation. Glycolysis was rather affected at its next steps: G6P is used by reaction 11 (isomerisation in F6P) to continue into the glycolysis or by reaction 14 (oxidation in R5P) to enter the PPP. Interestingly, V_{\max} (11) was lower in the cTPI antisense roots with 58.69 ± 1.50 and $73.76 \pm 2.80 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{FW.d}^{-1}$ in control roots and V_{\max} (14) values were similar between the two clones. Figure 2.4 shows that flux 11 (isomerisation) was decreased by around 40%. Given that the same carbon flows enter the glycolysis (R9 and R10) in the two clones, this means that the flux going to the PPP (R14) is proportionally more important in the cTPI antisense roots. These data are consistent with the results of tracer experiments (S. Dorion et al., 2012). Still, our dataset did not allow quantifying with confidence the PPP flux going back to glycolysis (R16), but one would expect this flux to be higher in antisense roots as it allows carbon to re-enter glycolysis while bypassing the TPI reaction. Also, the two late step reactions

of glycolysis, R12 and R13, revealed significantly lowered V_{max} values, a result correlating the lowered PYR concentration. For the TCA cycle, the estimated V_{max} values were lower than for the control. Nevertheless, the confidence intervals were relatively wide and a clear conclusion cannot be drawn. Finally, the biomass synthesis rate, (R26), and *a fortiori* the anabolic rates (R27 to 31) were higher in cTPI antisense roots agreeing with the increased growth activity that was observed experimentally (Figure 2.3). Nevertheless, the corresponding concentrations of macromolecules were not higher as growth constitutes a sink for precursors of cell building blocks.

Model validation has then been assessed comparing with literature and looking at specific physiological data such as energy requirements and oxygen consumption. At a first glance and from a general perspective, the match of experimental data and model simulations suggests that the chosen model structure is adequate. The V_{max} values obtained via the model calibration steps were within the ranges presented in literature; considering that V_{max} represents *in vivo* values, which are usually observed to be lower than those determined *in vitro* (Naegele et al., 2010; Schomburg et al., 2002). In addition, the requirement in ATP is typically known to be related to growth, with an approximate equivalence of 1 mole of ATP for an average 10 g DW of biomass (Kilburn, Lilly, & Webb, 1969). In our case, assuming a FW-to-DW ratio of 10, 25 and 46 mg DW of biomass, respectively for the control and the cTPI antisense clones, were synthesized after 6 d. Following this ATP/biomass relation, 2.5 and 4.6 mmol of ATP were necessary to cope with the respective biomass synthesis. Given that ATP is formed by the operation of the glycolytic pathway coupled to the TCA cycle and therefore mostly by the oxidative phosphorylation, we have verified if the model explained this ATP production with $q_{ATP} = 2r_{13} + r_{19} + 5r_{26}$. From the computation of simulations, we obtained that enough ATP (~10 and ~14 mmol for control and antisense, respectively) was produced for biomass synthesis and for the other requirements. In complement, the respiratory quotient (RQ) is also an interesting index of the cell physiological state as it represents the balance between the carbohydrate oxidation and the oxygen reduction, two consubstantial phenomena (Karlsson & Eliasson, 1955). RQ is defined as the ratio between the carbon dioxide release and the oxygen uptake (q_{CO2}/q_{O2}), which are described in our model as $q_{CO2} = r_{14} + r_{17} + r_{18} + r_{19} - r_{23} - 0.62 r_{27}$ and $q_{O2} = r_{25}$. Model simulated values for RQ that were close to 1 for both the control and the antisense at day 3 and day 6 (using the

experimental values for the oxygen uptake); a value normally reported during exponential growth (Kim, Weathers, & Wyslouzil, 2003). Finally, the model also showed that the catabolic primary fluxes (PPP, glycolysis, TCA cycle) were relatively stable at exponential growth for both clones as described by (Rontein, Dieuaide-Noubhani, Dufourc, Raymond, & Rolin, 2002).

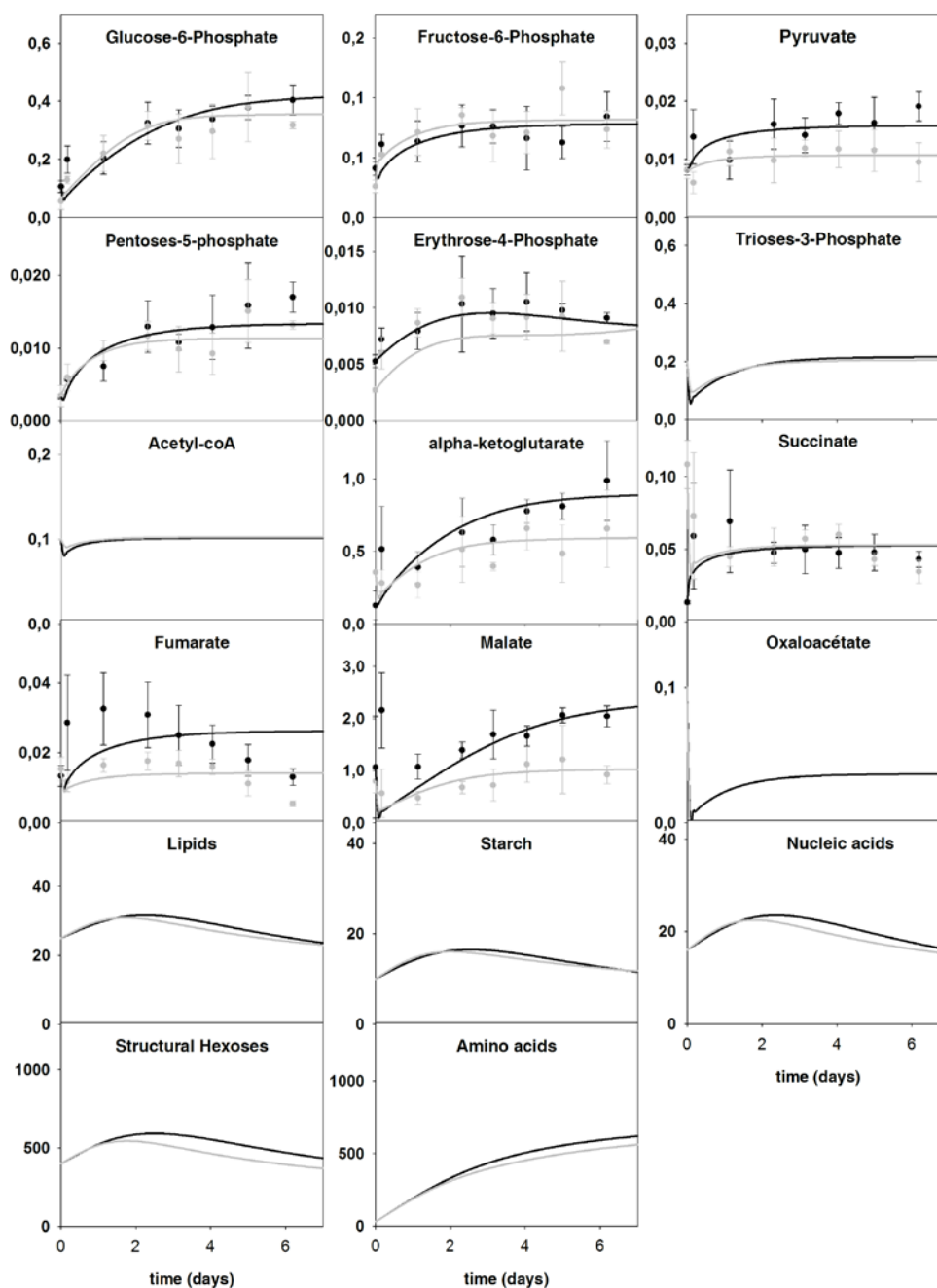


Figure 2.3 : Simulation and experimental data (in $\mu\text{mol.g}^{-1}$ FW) with glycolysis intermediates (G6P, F6P, PYR, T3P), PPP intermediates (R5P, E4P), TCA cycle intermediates (aKG, SUCC, FUM, MAL, OXA, ACOA) and cell building blocks (LIP, AA, STA, NUC, STH). Control in black, cTPI antisense in grey. Error bars represent the 95% confidence intervals of 5 independent samples.

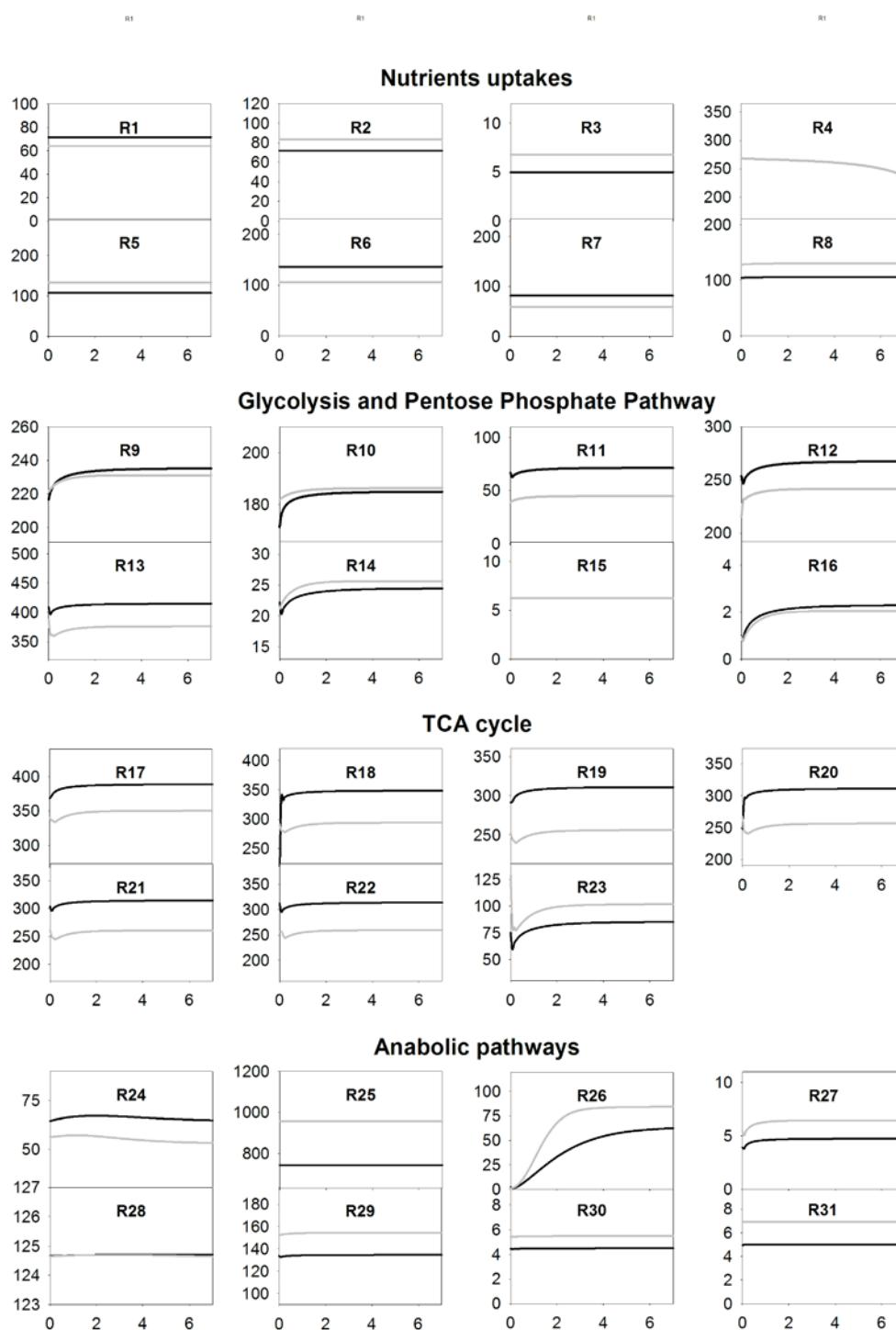


Figure 2.4 : Kinetic rates $r(t)$ in $\mu\text{mol.g}^{-1} \text{FW.d}^{-1}$ obtained via the simulations. Control in black, cTPI antisense in grey.

2.8.3 The cTPI : an enzyme located at a key branch point for metabolic engineering

A case of plastidic TPI deficiency was reported in the *Arabidopsis thaliana* *ptpi* mutant (Chen & Thelen, 2010) where the mutation induced death of young seedlings at the heterotrophic to autotrophic transition, presumably due to DHAP build-up in the plastid in combination to an inability to export DHAP. This leads to the formation of lethal methylglyoxal and cell death. The cytosolic TPI intervenes at a crucial branch point at mid-road of glycolysis leading to the glycerolipid synthesis and connecting with the PPP (W. C. Plaxton, 1996). Intuitively, one may have expected the clone with a lowered cTPI activity to show accumulation of metabolic intermediates above this point. Nevertheless, the presence of transporters between the plastid and the cytosol may allow plant cells to balance an abnormal level of one or another isoform by transporting metabolites from one compartment to the other (S. Dorion et al., 2012; Eicks, Maurino, Knappe, Flugge, & Fischer, 2002; Linka & Weber, 2010). Using model simulations, we observed that plant metabolism showed an increased flux entering the PPP in antisense cTPI roots. Also, as the growth rate was higher in the cTPI antisense clone, one can make the assumption that a greater flux was needed to feed the PPP since this pathway supplies precursors for macromolecules synthesis (R5P for nucleotides and E4P for aromatic amino acids) (Kruger & von Schaewen, 2003). This flux increase towards the PPP was reported in plant (S. Dorion et al., 2012) and in human metabolism (Olah et al., 2002) as a result of a reduction in TPI activity. Contrary to the situation observed in plant root (S. Dorion et al., 2012) the key enzyme G6PDH activity was increased in human TPI deficient cells (Olah et al., 2002). The oxidative step of PPP is known as a major source of NADPH (Kruger & von Schaewen, 2003), which is necessary for macromolecules synthesis (lipids, structural hexoses etc.). Therefore, this means that the plant primary metabolism is strongly adapted to the important cTPI decrease, by adjusting fluxes via metabolic bypasses avoiding the accumulation of G6P and F6P and more generally allowing cells to live. Thus, the circulation of carbon through interconnected pathways such as the glycolysis and PPP is another example of plant metabolism flexibility. Also, it would be expected to obtain increased lipids levels as the metabolism would have to cope with an accumulation of DHAP due to cTPI decrease. Furthermore, the decreased levels of TCA cycle intermediates support the idea that a lower cTPI activity would decrease the level of the downstream metabolites, following the

same logic as discussed previously i.e. that cTPI catalyzes a crucial crossing point reaction. The simulated enzymes activities V_{max} and fluxes were lower in the TCA cycle (R17 to R21) for the cTPI antisense clone. Nevertheless, confidence intervals were relatively wide for these estimated parameters. Also, an increase in the oxygen uptake rate is typically coupled to an increased TCA cycle activity (Ferne, Carrari, & Sweetlove, 2004) which is not the case according to the simulation. Still, this respiration paradigm was questioned by (Ferne et al., 2004; William C. Plaxton & Podestá, 2006) who invoked that there were several other metabolic bypasses taking part in the mitochondrial electron transport chain and contributing to the oxygen consumption. NAD(P)H dehydrogenases is one of those bypass shuttles providing electrons to the chain. (S. Dorion et al., 2012) suggested a role for these actors to partially explain dissipation of NADPH, produced via the PPP in cTPI antisense roots, and therefore the increased oxygen uptake rate compared to the control. This question will require more dedicated studies focusing on cell respiration and energy production.

2.9 Conclusions

In this work we have adapted and further developed a kinetic metabolic model to *S. tuberosum* hairy roots. Our experimental results on intracellular measurements of metabolites clearly suggest that a decrease in cTPI activity impacts on the plant cell primary metabolism. However, we also observed that a lower cTPI content resulted in a metabolic rearrangement leading to similar trends for the management of many nutrients and metabolites, then avoiding either metabolites accumulation (as for the upper part of the glycolysis) or limitation (as for TCA intermediates). The developed kinetic model thus showed to be helpful at characterizing and understanding metabolic fluxes modifications that can hardly be observable otherwise with the available data. For example, the model points to changes in individual reaction rates that are consistent with available analysis of pathway fluxes. It should be noted that the model describes neither cell compartmentalisation nor metabolic flux regulation mechanisms, and these should be specifically studied in a future work since it will provide a more precise estimation of the dynamics involved. Finally, this work clearly shows that this type of kinetic model can be a useful *in silico* tool to study the effect of modifying a specific enzyme activity within a complex metabolic network.

2.10 Acknowledgements

This project was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Canadian Foundation for Innovation (MJ) and the Canada Research Chair program (MJ). This work was supported in part by an NSERC Discovery grant to JR. We wish to thank Jingkui Chen (École Polytechnique Montréal) for the sugar phosphates, organics acids and anions LC analysis and Sonia Dorion (IRBV) for the help in cell culture and sugars analysis.

2.11 References

- Baltes M, Schneider R, Sturm C, Reuss M. 1994. Optimal Experimental Design for Parameter Estimation in Unstructured Growth Models. *Biotechnology progress* 10(5):480-488.
- Chen M, Thelen J. 2010. The plastid isoform of triose phosphate isomerase is required for the postgerminative transition from heterotrophic to autotrophic growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 22(1):77-90.
- Cloutier M, Bouchard-Marchand É, Perrier M, Jolicoeur M. 2008. A predictive nutritional model for plant cells and hairy roots. *Biotechnology and bioengineering* 99(1):189-200.
- Cloutier M, Chen J, De Dobbeleer C, Perrier M, Jolicoeur M. 2009. A systems approach to plant bioprocess optimization. *Plant biotechnology journal* 7(9):939-951.
- Cloutier M, Perrier M, Jolicoeur M. 2007. Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism. *Phytochemistry* 68(16-18):2393-2404.
- Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, Levine A, Granot D. 1999. Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* 11(7):1253-1266.
- Doran PM. 1997. *Hairy roots: culture and applications*: Harwood Academic Publishers.
- Dorion S, Clendenning A, Jeukens J, Salas J-J, Parveen N, Haner AA, Law RD, Force EM, Rivoal J. 2012. A large decrease of cytosolic triosephosphate isomerase in transgenic potato roots affects the distribution of carbon in primary metabolism. *Planta* (In press).

- Dorion S, Parveen, Jeukens J, Matton DP, Rivoal J. 2005. Cloning and characterization of a cytosolic isoform of triosephosphate isomerase developmentally regulated in potato leaves. *Plant Science* 168(1):183-194.
- Eicks M, Maurino V, Knappe S, Flugge UI, Fischer K. 2002. The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant physiology* 128(2):512-522.
- Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ. 2004. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current opinion in plant biology* 7(3):254-261.
- Hu Z-B, Du M. 2006. Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering. *Journal of integrative plant biology* 48(2):121-127.
- Hvoslef-Eide AK, Preil W. 2005. *Liquid Culture Systems for in Vitro Plant Propagation*: Springer.
- Karlsson B, Eliasson L. 1955. The Respiratory Quotient in Different Parts of Wheat Roots in Relation to Growth. *Physiol Plant* 8(3):561-571.
- Kilburn DG, Lilly MD, Webb FC. 1969. The energetics of mammalian cell growth. *J Cell Sci* 4(3):645-54.
- Kim YJ, Weathers PJ, Wyslouzil BE. 2003. Growth dynamics of *Artemisia annua* hairy roots in three culture systems. *Biotechnology and bioengineering* 83(4):428-43.
- Krishnan HB, Blanchette JT, Okita TW. 1985. Wheat invertases : characterization of cell wall-bound and soluble forms. *Plant physiology* 78(2):241-5.
- Kruger NJ, von Schaewen A. 2003. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current opinion in plant biology* 6(3):236-246.
- Lamboursain L, Jolicoeur M. 2005. Critical influence of *Eschscholzia californica* cells nutritional state on secondary metabolite production. *Biotechnology and bioengineering* 91(7):827-37.
- Lamboursain L, St-Onge F, Jolicoeur M. 2002. A Lab-Built Respirometer for Plant and Animal Cell Culture. *Biotechnology progress* 18(6):1377-1386.

- Leduc M, Tikhomiroff C, Cloutier M, Perrier M, Jolicoeur M. 2006. Development of a kinetic metabolic model: application to *Catharanthus roseus* hairy root. *Bioprocess and biosystems engineering* 28(5):295-313.
- Libourel IGL, Shachar-Hill Y. 2008. Metabolic Flux Analysis in Plants: From Intelligent Design to Rational Engineering. *Annu Rev Plant Biol.*
- Linka N, Weber AP. 2010. Intracellular metabolite transporters in plants. *Mol Plant* 3(1):21-53.
- Ljung L. 2001. System Identification. Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering: John Wiley & Sons, Inc.
- Ma JKC, Drake PMW, Christou P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet* 4(10):794-805.
- Mustroph A, Albrecht G, Hajirezaei M, Grimm B, Biemelt S. 2005. Low levels of pyrophosphate in transgenic potato plants expressing E-coli pyrophosphatase lead to decreased vitality under oxygen deficiency. *Annals of botany* 96(4):717-726.
- Naegele T, Henkel S, Hoermiller I, Sauter T, Sawodny O, Ederer M, Heyer AG. 2010. Mathematical Modeling of the Central Carbohydrate Metabolism in Arabidopsis Reveals a Substantial Regulatory Influence of Vacuolar Invertase on Whole Plant Carbon Metabolism. *Plant physiology* 153(1):260-272.
- Nolan RP, Lee K. 2011. Dynamic model of CHO cell metabolism. *Metabolic engineering* 13(1):108-124.
- Olah J, Orosz F, Keseru GM, Kovari Z, Kovacs J, Hollan S, Ovadi J. 2002. Triosephosphate isomerase deficiency: a neurodegenerative misfolding disease. *Biochem Soc Trans* 30(2):30-8.
- Petersen B, Gernaey K, Vanrolleghem PA. 2001. Practical identifiability of model parameters by combined respirometric-titrimetric measurements. *Water Sci Technol* 43(7):347-55.
- Plaxton WC. 1996. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:185-214.

- Plaxton WC. 1999. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. Lynch JP, Deikman J, editors. Rockville: Amer Soc Plant Biologists. 229-241 p.
- Plaxton WC, Podestá FE. 2006. The Functional Organization and Control of Plant Respiration. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25(2):159-198.
- Rivoal J, Hanson AD. 1993. Evidence for a large and sustained glycolytic flux to lactate in anoxic roots of some members of the halophytic genus *limonium*. *Plant physiology* 101(2):553-560.
- Rontein D, Dieuaide-Noubhani M, Dufourc EJ, Raymond P, Rolin D. 2002. The metabolic architecture of plant cells. Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. *The Journal of biological chemistry* 277(46):43948-60.
- Schomburg I, Chang AJ, Hofmann O, Ebeling C, Ehrentreich F, Schomburg D. 2002. BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic information. *Trends in Biochemical Sciences* 27(1):54-56.
- Schwender J. 2008. *Plant Metabolic Networks*: Springer.
- Shanks JV, Morgan J. 1999. Plant 'hairy root' culture. *Current opinion in biotechnology* 10(2):151-5.
- Sriram G, González-Rivera O, Shanks JV. 2006. Determination of Biomass Composition of *Catharanthus roseus* Hairy Roots for Metabolic Flux Analysis. *Biotechnology progress* 22(6):1659-1663.
- Tepfer D. 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiol Plant* 79(1):140-146.
- Vonschaewen A, Stitt M, Schmidt R, Sonnewald U, Willmitzer L. 1990. Expression of a Yeast-Derived Invertase in the Cell-Wall of Tobacco and Arabidopsis Plants Leads to Accumulation of Carbohydrate and Inhibition of Photosynthesis and Strongly Influences Growth and Phenotype of Transgenic Tobacco Plants. *Embo Journal* 9(10):3033-3044.

Walter É, Pronzato L. 1994. Identification de modèles paramétriques à partir de données expérimentales: Masson.

2.12 List of abbreviations

AA	Amino acids
AcoA	Acetyl Coenzyme A
ADP	Adenosine diphosphate
aKG	Alpha-ketoglutarate
AMP	Adenosine monophosphate
ATP	Adenosine triphosphate
CO ₂	Carbon dioxide
E_FRU	Fructose (extracellular)
E_GLC	Glucose (extracellular)
E_NH ₄	Ammonium (extracellular)
E_NO ₃	Nitrate (extracellular)
E_O ₂	Dioxygen (extracellular)
E_Pi	Inorganic Phosphate (extracellular)
E_SUC	Sucrose (extracellular)
E4P	Erythrose-4-phosphate
F6P	Fructose-6-Phosphate
FRU	Fructose
FUM	Fumaric acid
G6P	Glucose-6-Phosphate
GLC	Glucose
GLN	Glutamine
GLU	Glutamate

MAL	Malic acid
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP/NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized/reduced form)
NH ₄	Ammonium
NO ₃	Nitrate
NUC	Nucleic acids
OXA	Oxaloacetate
PEP	Phosphoenolpyruvate
Pi	Inorganic Phosphate
2PG	2-phosphoglycerate
3PG	3-phosphoglycerate
PYR	Pyruvate
R5P	Ribulose-5-phosphate
SUC	Sucrose
SUCC	Succinic acid
T3P	Triose-3-phosphate

Chapitre 3 DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce projet se donnait comme mandat de caractériser les différences au niveau métabolique résultant d'une diminution du niveau d'expression de l'enzyme cTPI. Ce chapitre présente la discussion des résultats obtenus via les mesures et le modèle mathématique présentés au chapitre précédent. Les limitations de l'étude sont également discutées.

3.1 Effet de la diminution du niveau d'expression de la cTPI

À première vue, les racines sous exprimant la cTPI ne présentent pas de différence morphologique notable avec les racines contrôle. Néanmoins, lors d'un suivi au cours du temps, nous avons observé une différence phénotypique majeure avec une croissance plus importante; partant d'une même masse d'inoculum, une biomasse humide plus importante a été obtenue après 6,5 jours de culture liquide. Cependant, il est à noter que cet effet d'une croissance plus rapide pourrait être reliée au clone sélectionné car cela n'a pas été observé dans le cas d'autres clones contenant différentes concentrations en cTPI et cultivées sur boîte de Pétri (S. Dorion et al., 2012). Également, la transformation résulte dans le transfert de gènes impliqués dans la synthèse d'hormone (auxine en particulier) et il n'y a pas de contrôle possible sur le niveau d'expression de ces gènes. On note en particulier qu'un faible niveau en cTPI (90 % diminué par rapport au niveau normal) n'empêche pas les racines de se développer. Comme on l'a signalé auparavant, cela n'est pas le cas pour le métabolisme humain où une déficience en TPI entraîne inexorablement la mort de par une accumulation en DHAP ensuite transformé en méthylglyoxal, un composé neurotoxique (Olah et al., 2002). Ce résultat montre bien l'adaptabilité du métabolisme végétal à des niveaux enzymatiques éloignées de leur niveau fondamental.

Aussi, notre intérêt a été d'étudier les effets d'une sous-expression de l'enzyme cytosolique cTPI afin de caractériser sur la redistribution des flux métaboliques assurant la survie et le développement des racines. Tout l'intérêt de notre étude résidant dans le fait que cette réaction est située au milieu de la glycolyse et à l'embranchement d'autres voies (pentoses phosphates et synthèse lipidique). Dans nos conditions expérimentales, nous avons observé que les concentrations des métabolites situés dans la partie haute de la glycolyse sont inchangées, signifiant que, soit la diminution de cTPI n'a aucun effet sur cette zone, soit que la distribution

des flux métaboliques s'est modifié en faisant circuler les molécules carbonées ailleurs et à des taux différents. Or d'après le modèle métabolique et les mesures de flux effectuées antérieurement (S. Dorion et al., 2012) c'est le deuxième cas de figure qui semble le plus approprié: on a en effet observé qu'un flux plus important allait proportionnellement plus vers la voie des pentoses phosphates évitant l'accumulation des intermédiaires supérieurs de la glycolyse. Des résultats (S. Dorion et al., 2012) ont aussi démontrés que les teneurs en lipides étaient augmentées, ce qui signifierait une déviation de molécules carbonées via la voie des triglycérides. Cependant, il faut rester vigilant sur les conclusions à établir car les études étaient effectuées dans des conditions expérimentales différentes (cuvée alimentée pour l'un cuvette pour l'autre, mais également utilisation de clones différents qui peuvent donc amener un comportement variable).

En aval de la réaction catalysée par la cTPI, on a observé que les concentrations de certains métabolites étaient diminuées parmi lesquelles, le pyruvate, le fumarate et l'alpha-cétoglutarate. Les données concernant le fumarate et le pyruvate contrastent avec celles obtenues par (S. Dorion et al., 2012) ce qui peut être dû à des différences dans les modes de cultures et être relié à l'utilisation de clones différents. Ceci était à coupler à des taux de réactions au niveau du TCA plus faibles simulés par le modèle. De prime abord ce résultat semble en contradiction avec une respiration accrue (d'après les mesures effectuées à 3 et 6 jours où les racines cTPI antisens respiraient de 20% de plus). Néanmoins, comme on l'a mentionné (S. Dorion et al., 2012) il peut y avoir un phénomène de découplage entre cycle TCA et l'oxydation phosphorylante. En effet d'autres composantes comme la NAD(P)H dehydrogenase de la membrane externe de la mitochondrie ou l'oxydase alternative peuvent causer un flux différentiel des électrons dans la chaîne respiratoire entre des racines ayant différents niveaux de cTPI. Cependant cette conclusion mériterait d'être étayée par des investigations plus profondes des composantes de la chaîne de transport des électrons.

La résumé de manière schématique les modifications relatives de flux après modification du niveau d'expression de la cTPI.

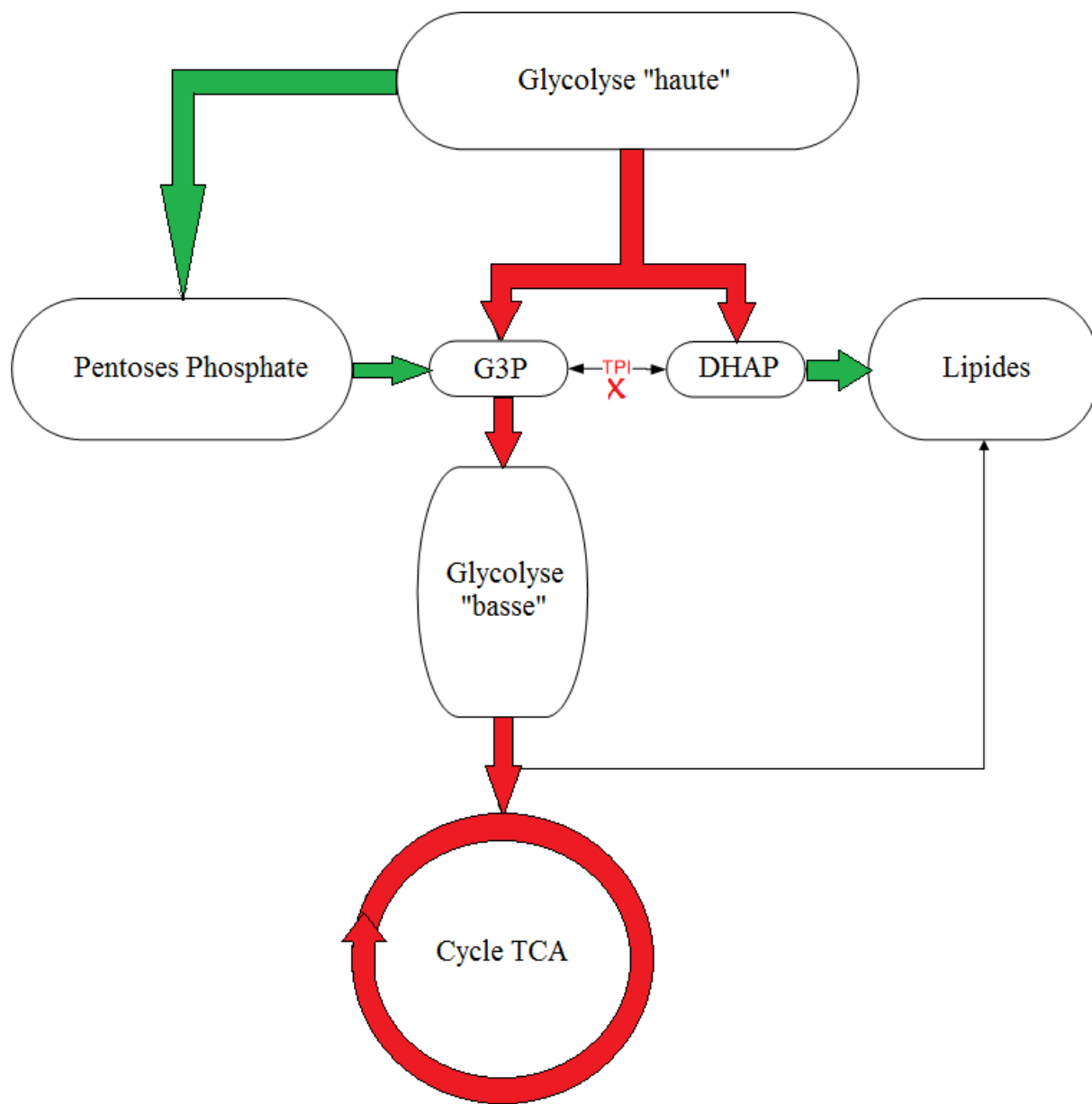


Figure 3.1 : Représentation schématique de l'effet de la diminution de la cTPI sur le métabolisme végétal

3.2 Limites de l'étude

3.2.1 Hypothèses de modélisation

Par définition, toute modélisation mathématique nécessite une simplification du système à décrire, ceci dans le but d'être en mesure de lui appliquer des outils et concepts (équations

différentielles, algèbre linéaire etc.). Par la suite, avec les résultats de simulations en mains, nous pouvons réévaluer nos choix de structure du modèle si celui-ci ne répond pas à nos attentes. Nous décrivons ici quelques hypothèses de modélisations :

- **Compartimentation de la cellule**

Une des limites du modèle est l'absence de prise en compte de la compartimentation intracellulaire des cellules végétales. Or, on sait que les compartiments possèdent des fonctions bien précises et en particulier sont le lieu de voies métaboliques précises. La glycolyse s'effectue par exemple parallèlement dans le cytosol et les plastes (W. C. Plaxton, 1996), puis le TCA et l'oxydation phosphorylante dans les mitochondries (Siedow & Umbach, 1995). En particulier, dans notre cas, seule la cTPI cytosolique a été sous-exprimée et les conclusions tirées sur les échanges entre PPP et glycolyse par exemple, sont globales sans rendre compte du fait des échanges possibles entre cytosol et plastides.

- **Identification des paramètres**

Il est important d'explicitier un peu comment l'étape d'identification s'est déroulée lors de ce projet. En effet, comme on l'a dit précédemment, on devait déterminer les paramètres V_{\max} . Pour cela, une première approche manuelle en employant les dérivées des concentrations pour regarder l'ordre de grandeur obtenu. Autrement dit, on trace de part et d'autres les dérivées dS_{exp}/dt et dS_{sim}/dt avec pour les concentrations expérimentales l'utilisation de splines pour obtenir une fonction continue et pouvoir en tirer facilement la dérivée. Les dérivées simulées étaient obtenues via le fichier *ode* directement. Ainsi, on pouvait voir si les valeurs de paramètres entrées étaient dans un ordre de grandeur acceptable. La deuxième étape consistait alors à utiliser des algorithmes de minimisation du type *fminsearch* portant sur la fonction objectif des moindres carrés. Il est important de noter que l'identification s'est ensuite faite par « morceaux ». On sait que l'identification numérique est limitée et il est impossible de fournir 30 paramètres à une fonction de minimisation en une fois, l'algorithme devant faire varier tous les paramètres à la fois. Ainsi, on a identifié par zone métabolique : d'abord les nutriments extra puis intracellulaires, les macromolécules constitutives puis le début de la glycolyse, le bas de la glycolyse et la voie des pentoses-phosphate et enfin le cycle TCA. Aussi il est important de noter que cette façon

arbitraire de procéder peut amener un certain jeu de paramètres et une autre façon amènerait potentiellement un autre résultat.

Également, il pourrait être intéressant de faire entrer en jeu les erreurs faites sur les mesures. Aussi, il est courant d'utiliser comme fonction objectif la fonction somme des carrés des résidus pondérée par les écart-types expérimentaux :

$$J(\theta) = \sum_{c_j} \sum_{i=1}^8 \frac{\left(\hat{c}_j(t_i, \theta) - c_{exp,j}(t_i) \right)^2}{\sigma_{i,j}}$$

Ainsi, un écart-type important se traduira par une plus faible importance de ces mesures dans la détermination des paramètres. Ce point peut être important en particulier puisque les concentrations mesurées (et les erreurs expérimentales associées) peuvent être très différentes en ordre de grandeur, d'un métabolite à un autre.

- **Considération des excrétions de matière**

Une autre limite du modèle est la simplification consistant à négliger les sorties du système. Les mesures extracellulaires sont en réalité plus faciles à effectuer (normalement sans étape d'extraction à réaliser) que les intracellulaires, mais en terme de modélisation, la prise en compte d'une sortie peut rendre le travail d'identification et d'analyse d'autant plus difficile. Alors même si en première approximation, négliger les excrétions de métabolites est acceptable, il est connu qu'une certaine quantité d'acides organiques (comme le malate ou le citrate) et de métabolites secondaires sont sécrétés hors de la cellule (de Andrade, Ikeda, Velho do Amaral, & Ishizuka, 2011; Lin et al., 2011; William C. Plaxton & Podestá, 2006). Ces études font état d'une excrétion allant autour de jusque 10 $\mu\text{mol/gFW/jour}$ ce qui ne représenterait que quelques % des flux de formation de citrate et malate. Les négliger en première approche semble donc légitime mais il peut être éventuellement important de les considérer afin de mieux rendre compte du devenir des métabolites du cycle de Krebs.

3.2.2 Système biologique utilisé

Utiliser des racines a son lot d'avantages et d'inconvénients. L'intérêt premier est sa culture facile (milieu entièrement défini et très simple) et sa croissance rapide, mais aussi et surtout le fait d'avoir des cellules différenciées ce qui n'est pas le cas pour des cellules en suspension. C'est

pour cette raison entre autres, que ces dernières donnent des rendements plus faibles en métabolites secondaires que des racines chevelues (Srivastava & Srivastava, 2007). De la même façon pour des applications en compréhension du métabolisme on peut questionner le fait d'utiliser des cellules en suspension indifférenciées. Néanmoins, une des limitations reste l'aspect hétérogène des racines. En effet, pour faire un suivi dynamique, cela a demandé une très grande quantité de biomasse (80 erlenmeyers pour chaque clone) car chaque erlenmeyer doit être « sacrifié » pour un échantillon, chaque mesure nécessitant une certaine quantité de matière (au moins 200 mg FW) pour être représentative. Enfin, cet aspect de tissu hétérogène limite l'utilisation de racines chevelues en bioréacteur car elle demande des équipements particuliers mais également parce l'hétérogénéité amène des problèmes de reproductibilité. Ces diverses raisons peuvent expliquer que cette approche reste très marginale en industrie. Néanmoins on voit bien l'intérêt du point de vue industrie biotechnologique compte tenu des applications diverses dont on a cité des exemples dans le chapitre de revue de littérature.

3.2.3 Validation du modèle

Une étape importante reste la validation du modèle par une expérience pensée en ce sens. Afin de la designer, on utilisera le modèle que l'on fera varier artificiellement au maximum (changements au niveau du milieu de culture etc.) pour observer certains comportements à recréer ensuite via une expérience en laboratoire afin finalement, de comparer simulations et mesures, et de conclure sur l'efficacité du modèle à prédire le métabolisme végétal.

CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Ces travaux de maîtrise proposaient de faire un nouveau pas dans la compréhension du métabolisme végétal via le développement d'un modèle métabolique dynamique. Un des apports du projet est la richesse et la diversité des données récoltées. Peu de projets font état d'un si grand nombre de mesures sur des intermédiaires des voies primaires végétales et ce pour un suivi au cours du temps. L'autre apport est le développement d'un modèle dynamique global donnant des indications sur le comportement dynamique des cellules végétales. On a pu donc apporter des éléments de réponse à la question : quel est l'effet de la modification du niveau d'une enzyme fondamentale (à savoir la TPI cytosolique) sur le reste du métabolisme primaire de cellules végétales ? En mettant en regard deux types d'informations : les concentrations métaboliques représentant l'état cellulaire via nos mesures, et les flux représentant les dynamiques cellulaires via le modèle cinétique.

Le modèle dynamique structuré a été développé et appliqué aux données expérimentales. Il partait d'un travail déjà effectué par d'autres étudiants du laboratoire sur le métabolisme végétal. Néanmoins son développement s'est voulu simplifié en essayant de considérer autant que faire se peut des réactions considérées comme importantes et faisant intervenir principalement des métabolites mesurées. Cette simplification nécessitait de faire le moins d'hypothèses possibles sur des intermédiaires réactionnelles non mesurés. Le modèle fait intervenir 40 métabolites pour 31 réactions représentant la glycolyse, la voie des pentoses phosphate, le cycle de Krebs, l'oxydation phosphorylative, et un certain nombre de voies anaboliques. Le modèle, de par son aspect dynamique a permis par exemple de conclure sur des différences de flux, conclusions que l'on aurait pu difficilement faire avec une approche uniquement en « mesures de concentrations ».

Une des idées de ces travaux de maîtrise était d'appliquer la méthode des avancements de réactions (*extents of reactions*) pour étudier le modèle différemment et améliorer l'identification des paramètres. Cette méthode développée par (Amrhein, Bhatt, Srinivasan, & Bonvin, 2010) permet de découper le problème par un traitement mathématique. La méthode étend la notion d'avancement de réaction aux entrées et sorties du système. Ainsi, le bilan massique originel était:

$$\begin{cases} \dot{n}(t) = \underbrace{N^T X(t) r(t)}_{TRANSF.} + \underbrace{W_{in} u_{in}(t)}_{IN} - \underbrace{\frac{u_{out}(t)}{m(t)} n(t)}_{OUT} \\ n(0) = n_0 \end{cases}$$

Si on note S le nombre de réactifs, et R le nombre de réactions. On a un système de S équations différentielles couplées (par la stœchiométrie N) non linéaires. Aussi, on comprend intuitivement qu'en étudiant les quantités de matière (ou de manière équivalente les concentrations), on étudie S états couplés entre eux. Ainsi, (Amrhein et al., 2010) décrivent un traitement mathématique qui permet d'obtenir un système d'équations équivalent au premier mais affranchi de la matrice N, responsable du couplage des équations :

$$\begin{cases} \frac{dx_{r,i}}{dt} = Vr_i - \frac{u_{out}}{m} x_{r,i} & x_{r,i}(0) = 0 \\ \frac{dx_{in,i}}{dt} = u_{in,j} - \frac{u_{out}}{m} x_{in,j} & x_{in,i}(0) = 0 \\ \frac{dx_{out}}{dt} = \frac{u_{out}}{m} (1 - x_{out}) & x_{out}(0) = 0 \end{cases} \quad (1)$$

$x_{r,i}$ représentent les avancements de réactions (au nombre de R), x_{in} les advancement d'entrée (au nombre p, le nombre d'entrées) et x_{out} l'avancement de sortie. Il existe également des variables au nombre de S-(R+p+1) dites invariantes toutes égales à zéro. On peut donc étudier réaction par réaction le système ceci étant permis par la connaissance préalable de la stœchiométrie. On gagne alors en précision d'identification puisqu'on découple les effets observés. Il faut noter cependant que l'obtention des avancements ne peut se faire que si l'on mesure au minimum autant de réactifs que de réactions et que les concentrations mesurées sont indépendantes (i.e. que la matrice N tronquée des colonnes des réactifs non mesurés soit de rang plein)

De manière schématique, voici la transformation :

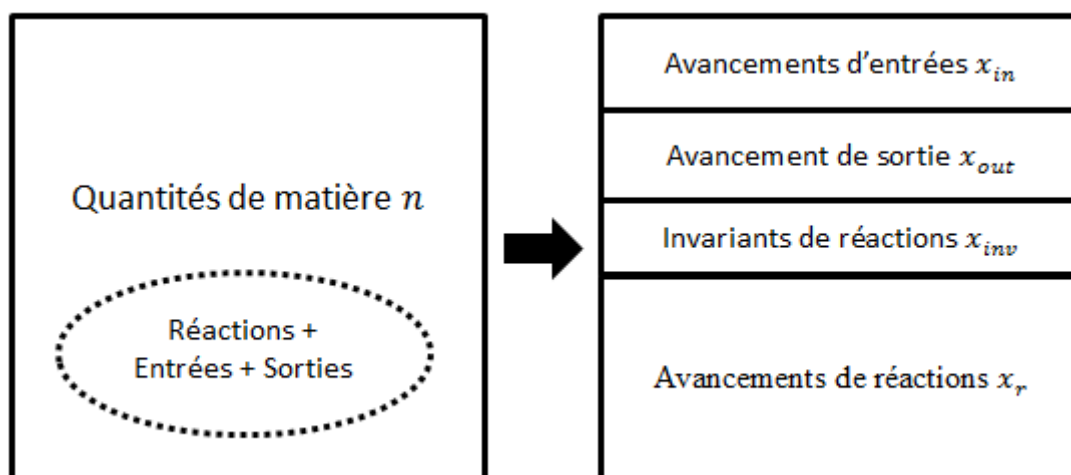


Figure 3.2 : Représentation schématique de la transformation mathématique des avancements de réaction

Un des éléments importants est la bonne connaissance de la matrice de stœchiométrie. Un travail sur la stœchiométrie peut être opéré afin de vérifier s'il est bien représentatif du système chimique, ceci peut se faire par un Target Factor Analysis (Harmon, Duboc, & Bonvin, 1994) qui vérifie entre autres, la conservation atomique dans le système.

Certaines limites du modèle appellent à des améliorations, la non considération de la compartimentation peut être adressée avec des mesures non invasives comme la RMN. Néanmoins dans son état, le modèle prouve de nouveau l'intérêt de l'approche globale mathématique pour s'attaquer à des problèmes de compréhension du métabolisme. On a prouvé le sens biologique que le modèle pouvait porter : description du taux de croissance, des consommations des nutriments, circulation du carbone dans les voies primaires, taux de respiration, estimation des flux énergétiques requis et voies anaboliques. Également, le modèle ne prend pas en compte des éléments de régulation dont on sait l'importance en métabolisme. Ceux-ci sont classiquement modélisés via des fonctions d'inhibition (de nature adaptable : compétitive, incompétitive etc.) dont on peut rendre compte dans les cinétiques réactionnelles. Ultimement, le modèle demande à être validé par une expérience pensée en ce sens et pour cela, on utilisera le modèle que l'on fera varier artificiellement au maximum pour designer l'expérience de validation.

Enfin, en termes métaboliques, on a observé que la cTPI avait un rôle important de par sa situation à la jonction de plusieurs voies métaboliques. Sa diminution a entraîné une augmentation des échanges entre voie des pentoses-phosphates et glycolyse, diminution de concentrations et de certains flux du cycle de Krebs, une augmentation du taux de respiration spécifique et un taux de croissance augmentée. Aussi, il serait intéressant d'aller plus loin en observant si ce résultat est observable chez des microalgues utilisées justement pour leur haute teneur lipidique (pouvant aller jusque 80% en poids sec) pour la production de biocarburants (Chisti, 2007; Q. Hu et al., 2008). De plus, la synthèse lipidique étant très demandante en NADPH, l'augmentation de flux à travers la voie des pentoses phosphates pourrait justement apporter une plus grande quantité de cet agent réducteur.

BIBLIOGRAPHIE

- Agostini, E., Coniglio, M. S., Milrad, S. R., Tigier, H. A., & Giulietti, A. M. (2003). Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol by *Brassica napus* hairy root cultures. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Biotechnology and applied biochemistry*, 37(Pt 2), 139-144. doi: 10.1042/
- Álvarez-Sánchez, B., Priego-Capote, F., & Castro, M. D. L. d. (2010). Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(2), 120-127. doi: 10.1016/j.trac.2009.12.004
- Amrhein, M., Bhatt, N., Srinivasan, B., & Bonvin, D. (2010). Extents of reaction and flow for homogeneous reaction systems with inlet and outlet streams. *AIChE Journal*, 56(11), 2873-2886. doi: 10.1002/aic.12125
- Antonio, C., Larson, T., Gilday, A., Graham, I., Bergström, E., & Thomas-Oates, J. (2007). Quantification of sugars and sugar phosphates in *Arabidopsis thaliana* tissues using porous graphitic carbon liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1172(2), 170-178. doi: 10.1016/j.chroma.2007.10.011
- Atkinson, D. E. (1968). Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*, 7(11), 4030-4034. doi: 10.1021/bi00851a033
- Baltes, M., Schneider, R., Sturm, C., & Reuss, M. (1994). Optimal Experimental Design for Parameter Estimation in Unstructured Growth Models. *Biotechnology progress*, 10(5), 480-488. doi: 10.1021/bp00029a005
- Bedair, M., & Sumner, L. W. (2008). Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(3), 238-250. doi: 10.1016/j.trac.2008.01.006
- Ben-Tchavtchavadze, M., Chen, J., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2010). A noninvasive technique for the measurement of the energetic state of free-suspension mammalian cells. *Biotechnology progress*, 26(2), 532-541. doi: 10.1002/btpr.333

- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry, Fifth Edition*: W.H. Freeman.
- Buchanan, B., Buchanan, B. B., & Gruissem, W. (2009). *Biochemistry & molecular biology of plants*: American Society of Plant Physiologists.
- Cardarelli, M., Spanò, L., Mariotti, D., Mauro, M. L., Sluys, M. A., & Costantino, P. (1987). The role of auxin in hairy root induction. *Molecular and General Genetics MGG*, 208(3), 457-463. doi: 10.1007/bf00328139
- Chang, Z., Guo, D., Shen, X., Wang, S., & Zheng, J. (1998). Anthraquinone production and analysis in the hairy root cultures of *Rheum palmatum* L. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Yao Xue Xue Bao*, 33(11), 869-872.
- Chassagnole, C., Noisommit-Rizzi, N., Schmid, J., Mauch, K., & Reuss, M. (2002). Dynamic Modeling of the Central Carbon Metabolism of *Escherichia coli*. 54 - 73.
- Chaudhury, A., & Pal, M. (2010). Induction of Shikonin Production in Hairy Root Cultures of *Arnebia hispidissima* via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated Genetic Transformation. *J. Crop Sci. Biotech*, 13(2), 99-106.
- Chen, M., & Thelen, J. (2010). The plastid isoform of triose phosphate isomerase is required for the postgerminative transition from heterotrophic to autotrophic growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22(1), 77-90.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294-306. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Choi, Y.-E., Kim, Y.-S., & Paek, K.-Y. (2006). Types And Designs Of Bioreactors For Hairy Root Culture
- Plan Tissue Culture Engineering. In S. D. Gupta & Y. Ibaraki (Eds.), (Vol. 6, pp. 161-172): Springer Netherlands.
- Cloutier, M., Bouchard-Marchand, É., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2008). A predictive nutritional model for plant cells and hairy roots. *Biotechnology and bioengineering*, 99(1), 189-200. doi: 10.1002/bit.21543

- Cloutier, M., Chen, J., De Dobbeleer, C., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2009). A systems approach to plant bioprocess optimization. *Plant biotechnology journal*, 7(9), 939-951. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00455.x
- Cloutier, M., Chen, J., Tatge, F., McMurray-Beaulieu, V., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2009). Kinetic metabolic modelling for the control of plant cells cytoplasmic phosphate. *Journal of theoretical biology*, 259(1), 118-131. doi: 10.1016/j.jtbi.2009.02.022
- Cloutier, M., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2007). Dynamic flux cartography of hairy roots primary metabolism. *Phytochemistry*, 68(16-18), 2393-2404. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.04.028
- Crawford, N. M., & Glass, A. D. M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 3(10), 389-395. doi: 10.1016/s1360-1385(98)01311-9
- Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Giller, Y., Ratner, K., . . . Granot, D. (1999). Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell*, 11(7), 1253-1266.
- Daniell, H., Streatfield, S. J., & Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. [Review]. *Trends Plant Sci*, 6(5), 219-226.
- de Andrade, L. R. M., Ikeda, M., Velho do Amaral, L. I., & Ishizuka, J. (2011). Organic acid metabolism and root excretion of malate in wheat cultivars under aluminium stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(1), 55-60. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.09.023
- Dettmer, K., Aronov, P. A., & Hammock, B. D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1), 51-78. doi: 10.1002/mas.20108
- Dey, P. M., Harborne, J. B., & Bonner, J. F. (1997). *Plant biochemistry*: Academic Press.
- Ding, J., Sorensen, C. M., Zhang, Q., Jiang, H., Jaitly, N., Livesay, E. A., . . . Metz, T. O. (2007). Capillary LC Coupled with High-Mass Measurement Accuracy Mass Spectrometry for Metabolic Profiling. *Analytical Chemistry*, 79(16), 6081-6093. doi: 10.1021/ac070080q

- Doran, P. M. (1997). *Hairy roots: culture and applications*: Harwood Academic Publishers.
- Dorion, S., Clendenning, A., Jeukens, J., Salas, J.-J., Parveen, N., Haner, A. A., . . . Rivoal, J. (2012). A large decrease of cytosolic triosephosphate isomerase in transgenic potato roots affects the distribution of carbon in primary metabolism. *Planta*, 236.
- Dorion, S., Parveen, Jeukens, J., Matton, D. P., & Rivoal, J. (2005). Cloning and characterization of a cytosolic isoform of triosephosphate isomerase developmentally regulated in potato leaves. *Plant Science*, 168(1), 183-194. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.07.029
- Eapen, S., Suseelan, K. N., Tivarekar, S., Kotwal, S. A., & Mitra, R. (2003). Potential for rhizofiltration of uranium using hairy root cultures of Brassica juncea and Chenopodium amaranticolor. *Environmental Research*, 91(2), 127-133. doi: 10.1016/s0013-9351(02)00018-x
- Eicks, M., Maurino, V., Knappe, S., Flugge, U. I., & Fischer, K. (2002). The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant physiology*, 128(2), 512-522.
- Ermayanti, T. M., McComb, J. A., & O'Brien, P. A. (1994). Growth and swainsonine production of Swainsona galegifolia (Andr.) R. Br. untransformed and transformed root cultures. *Journal of experimental botany*, 45(5), 633-639. doi: 10.1093/jxb/45.5.633
- Fell, D. A., & Sauro, H. M. (1990). Metabolic control analysis. *European Journal of Biochemistry*, 192(1), 183-187. doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb19212.x
- Fernie, A. R., Carrari, F., & Sweetlove, L. J. (2004). Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current opinion in plant biology*, 7(3), 254-261. doi: 10.1016/j.pbi.2004.03.007
- Furihata, T., Suzuki, M., & Sakurai, H. (1992). Kinetic Characterization of Two Phosphate Uptake Systems with Different Affinities in Suspension-Cultured Catharanthus roseus Protoplasts. *Plant and Cell Physiology*, 33(8), 1151-1157.
- Geigenberger, P. (2011). Regulation of Starch Biosynthesis in Response to a Fluctuating Environment. *Plant physiology*, 155(4), 1566-1577. doi: 10.1104/pp.110.170399

- Geigenberger, P., Tiessen, A., & Meurer, J. (2011). Use of Non-aqueous Fractionation and Metabolomics to Study Chloroplast Function in Arabidopsis Chloroplast Research in Arabidopsis. In R. P. Jarvis (Ed.), (Vol. 775, pp. 135-160): Humana Press.
- Gmati, D., Chen, J., & Jolicoeur, M. (2005). Development of a small-scale bioreactor: application to in vivo NMR measurement. *Biotechnology and bioengineering*, 89(2), 138-147. doi: 10.1002/bit.20293
- Gnoth, S., Jenzsch, M., Simutis, R., & Lübbert, A. (2007). Process Analytical Technology (PAT): Batch-to-batch reproducibility of fermentation processes by robust process operational design and control. *Journal of biotechnology*, 132(2), 180-186. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.03.020
- Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P. K., Rideau, M., & Gantet, P. (2006). Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current opinion in plant biology*, 9(3), 341-346. doi: 10.1016/j.pbi.2006.03.008
- Hames, B. D., & Hooper, N. M. (2005). *Instant Notes in Biochemistry*: Taylor & Francis.
- Harmon, J. L., Duboc, P., & Bonvin, D. (1994). Application of Factor-Analysis to the Resolution of Biochemical Reaction Networks. *Computers & Chemical Engineering*, 18, S645-S649.
- Harris, T. K., Cole, R. N., Comer, F. I., & Mildvan, A. S. (1998). Proton Transfer in the Mechanism of Triosephosphate Isomerase[†]. *Biochemistry*, 37(47), 16828-16838. doi: 10.1021/bi982089f
- Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R. M., & Fischer, R. (2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. [10.1038/nbt1027]. *Nat Biotech*, 22(11), 1415-1422.
- Hiller, J., Franco-Lara, E., Papaioannou, V., & Weuster-Botz, D. (2007). Fast sampling and quenching procedures for microbial metabolic profiling. *Biotechnology letters*, 29(8), 1161-1167. doi: 10.1007/s10529-007-9383-9

- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, 54(4), 621-639. doi: DOI 10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x
- Hu, Z.-B., & Du, M. (2006). Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering. *Journal of integrative plant biology*, 48(2), 121-127. doi: 10.1111/j.1744-7909.2006.00121.x
- Huber, S. C., & Huber, J. L. (1996). Role and Regulation of Sucrose-Phosphate Synthase in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 431-444. doi: doi:10.1146/annurev.arplant.47.1.431
- Hvoslef-Eide, A. K., & Preil, W. (2005). *Liquid Culture Systems for in Vitro Plant Propagation*: Springer.
- Ito, T., Sakai, H., & Meyerowitz, E. M. (2003). Whorl-specific expression of the SUPERMAN gene of Arabidopsis is mediated by cis elements in the transcribed region. [Article]. *Current Biology*, 13(17), 1524-1530. doi: 10.1016/s0960-9822(03)00612-2
- Jackson, W. A., Kwik, K. D., & Volk, R. J. (1976). Nitrate Uptake during Recovery from Nitrogen Deficiency. *Physiol Plant*, 36(2), 174-181. doi: 10.1111/j.1399-3054.1976.tb03931.x
- Jolicoeur, M. (1998). *Optimisation d'un procede de production de champignons endomycorhiziens en bioreacteur*. Ph.D. NQ46634, Ecole Polytechnique, Montreal (Canada), Canada. Retrieved from <http://search.proquest.com/docview/304481006?accountid=40695> Dissertations & Theses @ Ecole Polytechnique de Montreal; ProQuest Dissertations & Theses (PQDT) database.
- Kanani, H., Chrysanthopoulos, P. K., & Klapa, M. I. (2008). Standardizing GC-MS metabolomics. *Journal of Chromatography B*, 871(2), 191-201. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.04.049
- Karlsson, B., & Eliasson, L. (1955). The Respiratory Quotient in Different Parts of Wheat Roots in Relation to Growth. *Physiol Plant*, 8(3), 561-571. doi: 10.1111/j.1399-3054.1955.tb07752.x

- Kilburn, D. G., Lilly, M. D., & Webb, F. C. (1969). The energetics of mammalian cell growth. *J Cell Sci*, 4(3), 645-654.
- Kim, Y. J., Weathers, P. J., & Wyslouzil, B. E. (2003). Growth dynamics of *Artemisia annua* hairy roots in three culture systems. *Biotechnology and bioengineering*, 83(4), 428-443. doi: 10.1002/bit.10685
- Kirakosyan, A., Leland, J. C., & Kaufman, P. B. (2009). The Use of Plant Cell Biotechnology for the Production of Phytochemicals *Recent Advances in Plant Biotechnology* (pp. 15-33). Ann Arbor: Springer US.
- Knowles, J. R., & Albery, W. J. (1977). Perfection in enzyme catalysis: the energetics of triosephosphate isomerase. *Accounts of Chemical Research*, 10(4), 105-111. doi: 10.1021/ar50112a001
- Krishnan, H. B., Blanchette, J. T., & Okita, T. W. (1985). Wheat invertases : characterization of cell wall-bound and soluble forms. *Plant physiology*, 78(2), 241-245.
- Kruger, N. J., & von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current opinion in plant biology*, 6(3), 236-246. doi: 10.1016/s1369-5266(03)00039-6
- Lamboursain, L., & Jolicoeur, M. (2005). Critical influence of *Eschscholzia californica* cells nutritional state on secondary metabolite production. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Biotechnology and bioengineering*, 91(7), 827-837. doi: 10.1002/bit.20553
- Lamboursain, L., St-Onge, F., & Jolicoeur, M. (2002). A Lab-Built Respirometer for Plant and Animal Cell Culture. *Biotechnology progress*, 18(6), 1377-1386. doi: 10.1021/bp015511j
- Leduc, M., Tikhomiroff, C., Cloutier, M., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2006). Development of a kinetic metabolic model: application to *Catharanthus roseus* hairy root. *Bioprocess and biosystems engineering*, 28(5), 295-313. doi: 10.1007/s00449-005-0034-z
- Lee, R. B., & Rudge, K. A. (1986). Effects of Nitrogen Deficiency on the Absorption of Nitrate and Ammonium by Barley Plants. *Annals of botany*, 57(4), 471-486.

- Libourel, I. G. L., & Shachar-Hill, Y. (2008). Metabolic Flux Analysis in Plants: From Intelligent Design to Rational Engineering. *Annu Rev Plant Biol.*
- Lin, Z.-H., Chen, L.-S., Chen, R.-B., Zhang, F.-Z., Jiang, H.-X., Tang, N., & Smith, B. R. (2011). Root release and metabolism of organic acids in tea plants in response to phosphorus supply. *Journal of plant physiology*, 168(7), 644-652. doi: 10.1016/j.jplph.2010.09.017
- Linka, N., & Weber, A. P. (2010). Intracellular metabolite transporters in plants. [Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.
Review]. *Mol Plant*, 3(1), 21-53. doi: 10.1093/mp/ssp108
- Liu, X., Liu, H., Ye, L., Li, S., Wu, B., Wang, H., . . . Chen, Z. (2010). Metabolic characteristics and kinetic model of recombinant CHO cells in serum-free suspension batch culture. *Shengwu Gongcheng Xuebao/Chinese Journal of Biotechnology*, 26(1), 85-92.
- Ljung, L. (2001). System Identification *Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering*: John Wiley & Sons, Inc.
- López-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M. F., Ramírez-Rodríguez, V., & Herrera-Estrella, L. (2000). Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*, 160(1), 1-13.
- Ma, J. K. C., Drake, P. M. W., & Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. [10.1038/nrg1177]. *Nat Rev Genet*, 4(10), 794-805.
- Mackenzie, S., & McIntosh, L. (1999). Higher Plant Mitochondria. *The Plant Cell Online*, 11(4), 571-586. doi: 10.1105/tpc.11.4.571
- Mashego, M., Rumbold, K., De Mey, M., Vandamme, E., Soetaert, W., & Heijnen, J. (2007). Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnology letters*, 29(1), 1-16. doi: 10.1007/s10529-006-9218-0
- Morandini, P. (2009). Rethinking metabolic control. [Review]. *Plant Science*, 176(4), 441-451. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.01.005

- Munson, J., Stanfield, C. F., & Gujral, B. (2006). A review of process analytical technology (PAT) in the US pharmaceutical industry. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2(4), 405-414.
- Mustroph, A., Albrecht, G., Hajirezaei, M., Grimm, B., & Biemelt, S. (2005). Low levels of pyrophosphate in transgenic potato plants expressing E-coli pyrophosphatase lead to decreased vitality under oxygen deficiency. *Annals of botany*, 96(4), 717-726. doi: Doi 10.1093/Aob/Mci223
- Naegele, T., Henkel, S., Hoermiller, I., Sauter, T., Sawodny, O., Ederer, M., & Heyer, A. G. (2010). Mathematical Modeling of the Central Carbohydrate Metabolism in Arabidopsis Reveals a Substantial Regulatory Influence of Vacuolar Invertase on Whole Plant Carbon Metabolism. *Plant physiology*, 153(1), 260-272. doi: 10.1104/pp.110.154443
- Neuhaus, H. E., & Emes, M. J. (2000). Nonphotosynthetic metabolism in plastids. [Review]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 111-140. doi: 10.1146/annurev.arplant.51.1.111
- Nolan, R. P., & Lee, K. (2011). Dynamic model of CHO cell metabolism. *Metabolic engineering*, 13(1), 108-124. doi: 10.1016/j.ymben.2010.09.003
- Olah, J., Orosz, F., Keseru, G. M., Kovari, Z., Kovacs, J., Hollan, S., & Ovadi, J. (2002). Triosephosphate isomerase deficiency: a neurodegenerative misfolding disease. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Biochem Soc Trans*, 30(2), 30-38. doi: 10.1042/
- Petersen, B., Gernaey, K., & Vanrolleghem, P. A. (2001). Practical identifiability of model parameters by combined respirometric-titrimetric measurements. *Water Sci Technol*, 43(7), 347-355.
- Plaxton, W. C. (1996). The organization and regulation of plant glycolysis. [Review]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 185-214. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.185
- Plaxton, W. C. (1999). *Metabolic aspects of phosphate starvation in plants* (Vol. 19). Rockville: Amer Soc Plant Biologists.

- Plaxton, W. C., & Podestá, F. E. (2006). The Functional Organization and Control of Plant Respiration. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(2), 159-198. doi: 10.1080/07352680600563876
- Raghothama, K., & Karthikeyan, A. (2005). Phosphate acquisition
- Root Physiology: from Gene to Function. In H. Lambers & T. Colmer (Eds.), (Vol. 4, pp. 37-49): Springer Netherlands.
- Ralf, S. (2007). Computational approaches to the topology, stability and dynamics of metabolic networks. *Phytochemistry*, 68(16-18), 2139-2151. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.04.041
- Ratcliffe, R. G., & Shachar-Hill, Y. (2005). Revealing metabolic phenotypes in plants: inputs from NMR analysis. *Biological Reviews*, 80(1), 27-43. doi: 10.1017/s1464793104006530
- Rios-Esteva, R., & Lange, B. M. (2007). Experimental and mathematical approaches to modeling plant metabolic networks. *Phytochemistry*, 68(16-18), 2351-2374. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.04.021
- Ritter, J. B., Genzel, Y., & Reichl, U. (2008). Simultaneous extraction of several metabolites of energy metabolism and related substances in mammalian cells: Optimization using experimental design. *Analytical biochemistry*, 373(2), 349-369. doi: 10.1016/j.ab.2007.10.037
- Rivoal, J., & Hanson, A. D. (1993). Evidence for a large and sustained glycolytic flux to lactate in anoxic roots of some members of the halophytic genus *limonium*. [Article]. *Plant physiology*, 101(2), 553-560.
- Rohwer, J. M., & Botha, F. C. (2001). Analysis of sucrose accumulation in the sugar cane culm on the basis of in vitro kinetic data. *Biochemical Journal*, 358(2), 437-445.
- Rontein, D., Dieuaide-Noubhani, M., Dufourc, E. J., Raymond, P., & Rolin, D. (2002). The metabolic architecture of plant cells. Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *The Journal of biological chemistry*, 277(46), 43948-43960. doi: 10.1074/jbc.M206366200

- Sasaki, K., Udagawa, A., Ishimaru, H., Hayashi, T., Alfermann, A. W., Nakanishi, F., & Shimomura, K. (1998). High forskolin production in hairy roots of *Coleus forskohlii*. *Plant cell reports*, 17(6), 457-459. doi: 10.1007/s002990050425
- Schachtman, D. P., Reid, R. J., & Ayling, S. M. (1998). Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant physiology*, 116(2), 447-453. doi: 10.1104/pp.116.2.447
- Schauer, N., Zamir, D., & Fernie, A. R. (2005). Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. *Journal of experimental botany*, 56(410), 297-307. doi: 10.1093/jxb/eri057
- Schomburg, I., Chang, A. J., Hofmann, O., Ebeling, C., Ehrentreich, F., & Schomburg, D. (2002). BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic information. [Editorial Material]. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(1), 54-56. doi: 10.1016/s0968-0004(01)02027-8
- Schwender, J. (2008). *Plant Metabolic Networks*: Springer.
- Schwender, J. (2009). Kinetic Properties of Metabolic Networks
- Plant Metabolic Networks. In J. Schwender (Ed.), (pp. 307-322): Springer New York.
- Shanks, J. V., & Morgan, J. (1999). Plant 'hairy root' culture. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.
- Review]. *Current opinion in biotechnology*, 10(2), 151-155.
- Siedow, J. N., & Umbach, A. L. (1995). Plant Mitochondrial Electron Transfer and Molecular Biology. *The Plant Cell Online*, 7(7), 821-831. doi: 10.1105/tpc.7.7.821
- Sriram, G., González-Rivera, O., & Shanks, J. V. (2006). Determination of Biomass Composition of *Catharanthus roseus* Hairy Roots for Metabolic Flux Analysis. *Biotechnology progress*, 22(6), 1659-1663. doi: 10.1021/bp060162k
- Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2007). Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites. *Critical reviews in biotechnology*, 27(1), 29-43. doi: 10.1080/07388550601173918

- Stephanopoulos, G., Aristidou, A. A., Nielsen, J. H., & Nielsen, J. (1998). *Metabolic engineering: principles and methodologies*: Academic Press.
- Stewart, B. J., Navid, A., Turteltaub, K. W., & Bench, G. (2010). Yeast Dynamic Metabolic Flux Measurement in Nutrient-Rich Media by Hplc and Accelerator Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 82(23), 9812-9817. doi: 10.1021/ac102065f
- Sturm, A. (1999). Invertases. Primary Structures, Functions, and Roles in Plant Development and Sucrose Partitioning. *Plant physiology*, 121(1), 1-8. doi: 10.1104/pp.121.1.1
- Sumner, L. W., Mendes, P., & Dixon, R. A. (2003). Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, 62(6), 817-836. doi: 10.1016/s0031-9422(02)00708-2
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*: Sinauer Associates, Incorporated.
- Tepfer, D. (1984). Transformation of several species of higher plants by agrobacterium rhizogenes: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, 37(3), 959-967. doi: 10.1016/0092-8674(84)90430-6
- Tepfer, D. (1990). Genetic transformation using Agrobacterium rhizogenes. *Physiol Plant*, 79(1), 140-146. doi: 10.1111/j.1399-3054.1990.tb05876.x
- Theobald, U., Mailinger, W., Reuss, M., & Rizzi, M. (1993). In Vivo Analysis of Glucose-Induced Fast Changes in Yeast Adenine Nucleotide Pool Applying a Rapid Sampling Technique. *Analytical biochemistry*, 214(1), 31-37. doi: 10.1006/abio.1993.1452
- Theodoridis, G., Gika, H. G., & Wilson, I. D. (2008). LC-MS-based methodology for global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(3), 251-260. doi: 10.1016/j.trac.2008.01.008
- Tikhomiroff, C., Allais, S., Klvana, M., Hisiger, S., & Jolicoeur, M. (2002). Continuous Selective Extraction of Secondary Metabolites from Catharanthus roseus Hairy Roots with Silicon Oil in a Two-Liquid-Phase Bioreactor. *Biotechnology progress*, 18(5), 1003-1009. doi: 10.1021/bp0255558

- Tjaden, J., Möhlmann, T., Kampfenkel, K., & Neuhaus, Gudrun H. a. E. (1998). Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato (*Solanum tuberosum*L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch. *The Plant Journal*, 16(5), 531-540. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00317.x
- Tolstikov, V. V., & Fiehn, O. (2002). Analysis of Highly Polar Compounds of Plant Origin: Combination of Hydrophilic Interaction Chromatography and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Analytical biochemistry*, 301(2), 298-307. doi: 10.1006/abio.2001.5513
- Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B. t., & Citovsky, V. (2004). Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models. *Trends in genetics : TIG*, 20(8), 375-383.
- Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B. t., & Citovsky, V. (2004). Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models. *Trends in Genetics*, 20(8), 375-383. doi: 10.1016/j.tig.2004.06.004
- Ullrich-Eberius, C. I., Novacky, A., & Bel, A. J. E. (1984). Phosphate uptake in<i>Lemna gibba G1: energetics and kinetics. *Planta*, 161(1), 46-52. doi: 10.1007/bf00951459
- Usuda, Y., Nishio, Y., Iwatani, S., Van Dien, S. J., Imaizumi, A., Shimbo, K., . . . Matsui, K. (2010). Dynamic modeling of Escherichia coli metabolic and regulatory systems for amino-acid production. *Journal of biotechnology*, 147(1), 17-30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.02.018
- Visser, D., & Heijnen, J. (2002). The Mathematics of Metabolic Control Analysis Revisited. *Metabolic engineering*, 4, 114 - 123.
- Vonschaewen, A., Stitt, M., Schmidt, R., Sonnewald, U., & Willmitzer, L. (1990). Expression of a Yeast-Derived Invertase in the Cell-Wall of Tobacco and Arabidopsis Plants Leads to Accumulation of Carbohydrate and Inhibition of Photosynthesis and Strongly Influences Growth and Phenotype of Transgenic Tobacco Plants. *Embo Journal*, 9(10), 3033-3044.
- Walsh, G. (2010). Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nature Biotechnology*, 28(9), 917-924.
- Walter, É., & Pronzato, L. (1994). *Identification de modèles paramétriques à partir de données expérimentales*: Masson.

- Weathers, P., Towler, M., & Xu, J. (2010). Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(5), 1339-1351. doi: 10.1007/s00253-009-2354-4
- Wolf, S., Grsic-Rausch, S., Rausch, T., & Greiner, S. (2003). Identification of pollen-expressed pectin methylesterase inhibitors in Arabidopsis. *FEBS letters*, 555(3), 551-555. doi: 10.1016/s0014-5793(03)01344-9
- Wysocki, V. H., Resing, K. A., Zhang, Q., & Cheng, G. (2005). Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods*, 35(3), 211-222. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.08.013
- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(1), 89-103.
- Zhang, L., Ding, R., Chai, Y., Bonfill, M., Moyano, E., Oksman-Caldentey, K.-M., . . . Tang, K. (2004). Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17), 6786-6791. doi: 10.1073/pnas.0401391101

ANNEXE 1 : Matrice de stœchiométrie

	E_ NO 3	E_ NH 4	E_ P i	E_ O2	E_ S UC	E_ GL C	E_ F RU	NO 3	NH 4	Pi	SU C	GL C	FR U	G6 P	F6P	PY R	R5 P	E4P	aK G	SU CC	FU M	MA L	AT P	AD P	AM P	NA DP H	X	T3P	Aco A	OX A	NA D+	NA DH	NA DP +	Ppi	NU C	AA	ST H	ST A	LIP	CO 2		
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32	M33	M34	M35	M36	M37	M38	M39	M40		
R1	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R2	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R3	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R4	0	0	0	0	-1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R5	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R6	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R7	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	-2	0	0	0	-1	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	-2	0	0	0	0	0	0	0	1
R15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
R18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
R19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
R20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	1	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
R23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	-1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
R24	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-3	0	0	0	0	1	-1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R25	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	-2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	-2,5	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,048	0,085	1,018	0,042	0,020	0	
R27	0	0	0	0	0	0	0	0	-1,62	3,24	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0,62	0	-4,24	3,24	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1,07	-1,62	0	0	0	-0,62	
R28	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0,84	0	0	0	0	0	-0,21	0	-0,05	-0,3	0	0	0	-0,34	0,34	0	-0,3	0	-0,25	0	-0,29	0,27	-0,24	0,29	0	0	1,38	0	0	0	0	0	
R29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	-2	2	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	
R30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
R31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-7	7	0	-15	0	-1	-8	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	1	0	0	

ANNEXE 2 : Fichiers Matlab

Fichier modelisation main control.m

```

clear all
close all

tic

%% LOADING DATAS %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
load datas_controle.txt % en umol/L
load datas_controle_manquantes.txt
S_meas = 30;
global t_exp
t_exp = datas_controle(1:8,1); % en jours
global X_exp
X_exp = datas_controle(1:8,3); % en gFW
global stdev_X_exp
stdev_X_exp=1.96./sqrt(10).*datas_controle(9:16,3);

global V_exp
V_exp = datas_controle(1:8,2); % en L
global stdev_V_exp
stdev_V_exp = 1.96./sqrt(10).*datas_controle(9:16,2);

% 7 extra-cellulaires
global E_NO3_exp stdev_E_NO3_exp
E_NO3_exp=datas_controle(1:8,4); % en uM
stdev_E_NO3_exp=1.96./sqrt(10).*datas_controle(9:16,4);

global E_NH4_exp stdev_E_NH4_exp
E_NH4_exp=datas_controle(1:8,5); % en uM
stdev_E_NH4_exp=1.96./sqrt(10).*datas_controle(9:16,5);

global E_Pi_exp stdev_E_Pi_exp
E_Pi_exp=datas_controle(1:8,6); % en uM
stdev_E_Pi_exp=1.96./sqrt(10).*datas_controle(9:16,6);

global E_O2_exp stdev_E_O2_exp
E_O2_exp=10000000000.*datas_controle(1:8,7); % en uM
stdev_E_O2_exp=1.96./sqrt(10).*datas_controle(9:16,7);

global E_SUC_exp stdev_E_SUC_exp
E_SUC_exp=datas_controle(1:8,8); % en uM<
stdev_E_SUC_exp=1.96./sqrt(10).*datas_controle(9:16,8);

global E_GLC_exp stdev_E_GLC_exp
E_GLC_exp=datas_controle(1:8,9); % en uM
stdev_E_GLC_exp=1.96./sqrt(1).*datas_controle(9:16,9);

global E_FRU_exp stdev_E_FRU_exp
E_FRU_exp=datas_controle(1:8,10); % en uM
stdev_E_FRU_exp=1.96./sqrt(1).*datas_controle(9:16,10);

```

```

% intracellulaires = 21
global NO3_exp stdev_NO3_exp
NO3_exp=datas_controle(1:8,11);
stdev_NO3_exp=1.96./sqrt(2).*datas_controle(9:16,11);

global NH4_exp stdev_NH4_exp
NH4_exp=datas_controle(1:8,12);
stdev_NH4_exp=1.96./sqrt(2).*datas_controle(9:16,12);

global Pi_exp stdev_Pi_exp
Pi_exp=datas_controle(1:8,13);
stdev_Pi_exp=1.96./sqrt(2).*datas_controle(9:16,13);

global SUC_exp stdev_SUC_exp
SUC_exp=datas_controle(1:8,14);
stdev_SUC_exp=1.96./sqrt(1).*datas_controle(9:16,14);

global GLC_exp stdev_GLC_exp
GLC_exp=datas_controle(1:8,15);
stdev_GLC_exp=1.96./sqrt(1).*datas_controle(9:16,15);

global FRU_exp stdev_FRU_exp
FRU_exp=datas_controle(1:8,16);
stdev_FRU_exp=1.96./sqrt(1).*datas_controle(9:16,16);

global G6P_exp stdev_G6P_exp
G6P_exp=datas_controle(1:8,17);
stdev_G6P_exp=1.96./sqrt(4).*datas_controle(9:16,17);

global F6P_exp stdev_F6P_exp
F6P_exp=datas_controle(1:8,18);
stdev_F6P_exp=1.96./sqrt(4).*datas_controle(9:16,18);

global PYR_exp stdev_PYR_exp
PYR_exp=datas_controle(1:8,19);
stdev_PYR_exp=1.96./sqrt(4).*datas_controle(9:16,19);

global R5P_exp stdev_R5P_exp
R5P_exp=datas_controle(1:8,20);
stdev_R5P_exp=1.96./sqrt(4).*datas_controle(9:16,20);

global E4P_exp stdev_E4P_exp
E4P_exp=datas_controle(1:8,21);
stdev_E4P_exp=1.96./sqrt(4).*datas_controle(9:16,21);

global aKT_exp stdev_aKT_exp
aKT_exp=datas_controle(1:8,22);
stdev_aKT_exp=1.96./sqrt(4).*datas_controle(9:16,22);

global SUCC_exp stdev_SUCC_exp
SUCC_exp=datas_controle(1:8,23);
stdev_SUCC_exp=1.96./sqrt(4).*datas_controle(9:16,23);

```

```

global FUM_exp stdev_FUM_exp
FUM_exp=datas_controle(1:8,24);
stdev_FUM_exp=1.96./sqrt(4).*datas_controle(9:16,24);

global MAL_exp stdev_MAL_exp
MAL_exp=datas_controle(1:8,25);
stdev_MAL_exp=1.96./sqrt(4).*datas_controle(9:16,25);

global ATP_exp stdev_ATP_exp
ATP_exp=datas_controle(1:8,26);
stdev_ATP_exp=1.96./sqrt(3).*datas_controle(9:16,26);

global ADP_exp stdev_ADP_exp
ADP_exp=datas_controle(1:8,27);
stdev_ADP_exp=1.96./sqrt(3).*datas_controle(9:16,27);

global AMP_exp stdev_AMP_exp
AMP_exp=datas_controle(1:8,28);
stdev_AMP_exp=1.96./sqrt(3).*datas_controle(9:16,28);

global NADPH_exp stdev_NADPH_exp
NADPH_exp=datas_controle(1:8,29);
stdev_NADPH_exp=1.96./sqrt(3).*datas_controle(9:16,29);

load stoech.txt;

global N
N=stoech;
sizeN=size(N)

tdeb = 0;
tfin = 7;
Nb_points = 100;
tspan = linspace(tdeb,tfin,Nb_points);

global pas
pas = t_exp(2:end)-t_exp(1:end-1); %pas avec temps expérimental

%% SPLINES INTERPOLATION %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% figure(12)

% % SPLINE E_NO3
% a = 5;
% b = 7;
% i = 1;
% subplot(a,b,i)
global E_NO3spline
E_NO3spline = spline(t_exp,E_NO3_exp);
dE_NO3spline = fnder(E_NO3spline,1);

```

```

%
plot(t_exp,E_NO3_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(E_NO3spline,tspan),'r--',tspan,ppval(dE_NO3spline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(E_NO3spline,tspan))])
% title('spline E_NO3')
%
% % SPLINE E_NH4
% a = 5;
% b = 7;
% i = 1;
% subplot(a,b,i)
E_NH4spline = spline(t_exp,E_NH4_exp);
dE_NH4spline = fnder(E_NH4spline,1);
%
plot(t_exp,E_NH4_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(E_NH4spline,tspan),'r--',tspan,ppval(dE_NH4spline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(E_NH4spline,tspan))])
% title('spline E_NH4')
%
% % SPLINE E_Pi
% a = 5;
% b = 7;
% i = 1;
% subplot(a,b,i)
E_Pispline = spline(t_exp,E_Pi_exp);
dE_Pispline = fnder(E_Pispline,1);
%
plot(t_exp,E_Pi_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(E_Pispline,tspan),'r--',tspan,ppval(dE_Pispline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(E_Pispline,tspan))])
% title('spline E_Pi')
%
% % SPLINE E_O2
% a = 5;
% b = 7;
% i = 1;
% subplot(a,b,i)
E_O2spline = spline(t_exp,E_O2_exp);
dE_O2spline = fnder(E_O2spline,1);
%
plot(t_exp,E_O2_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(E_O2spline,tspan),'r--',tspan,ppval(dE_O2spline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(E_O2spline,tspan))])
% title('spline E_O2')
%
% % SPLINE E_SUC
% a = 5;
% b = 7;
% i = 1;
% subplot(a,b,i)
E_SUCspline = spline(t_exp,E_SUC_exp);
dE_SUCspline = fnder(E_SUCspline,1);

```

```

%
plot(t_exp,E_SUC_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(E_S
UCspline,tspan),'r--',tspan,ppval(dE_SUCspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(E_SUCspline,tspan))])
% title('spline E_SUC')
%
% % SPLINE E_GLC
% a = 5;
% b = 7;
% i = 1;
% subplot(a,b,i)
E_GLCspline = spline(t_exp,E_GLC_exp);
dE_GLCspline = fnder(E_GLCspline,1);
%
plot(t_exp,E_GLC_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(E_G
LCspline,tspan),'r--',tspan,ppval(dE_GLCspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(E_GLCspline,tspan))])
% title('spline E_GLC')
%
% % SPLINE E_FRU
% a = 5;
% b = 7;
% i = 1;
% subplot(a,b,i)
E_FRUspline = spline(t_exp,E_FRU_exp);
dE_FRUspline = fnder(E_FRUspline,1);
%
plot(t_exp,E_FRU_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(E_F
RUspline,tspan),'r--',tspan,ppval(dE_FRUspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(E_FRUspline,tspan))])
% title('spline E_FRU')
%
% % SPLINE NO3
% a = 5;
% b = 7;
% i = 1;
% subplot(a,b,i)
NO3spline = spline(t_exp,NO3_exp);
dNO3spline = fnder(NO3spline,1);
%
plot(t_exp,NO3_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(NO3sp
line,tspan),'r--',tspan,ppval(dNO3spline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(NO3spline,tspan))])
% title('spline NO3')
%
% % SPLINE NH4
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
NH4spline = spline(t_exp,NH4_exp);
dNH4spline = fnder(NH4spline,1);
%
plot(t_exp,NH4_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(NH4sp
line,tspan),'r--',tspan,ppval(dNH4spline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(NH4spline,tspan))])
% title('NH4')

```

```

%
% % SPLINE Pi
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
Pispline = spline(t_exp,Pi_exp);
dPispline = fnder(Pispline,1);
%
plot(t_exp,Pi_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(Pispline,tspan),'r--',tspan,ppval(dPispline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(Pispline,tspan))])
% title('Pi')
%
% % SPLINE SUC
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
SUCspline = spline(t_exp,SUC_exp);
dSUCspline = fnder(SUCspline,1);
%
plot(t_exp,SUC_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(SUCspline,tspan),'r--',tspan,ppval(dSUCspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(SUCspline,tspan))])
% title('SUC')
%
% % SPLINE GLC
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
GLCspline = spline(t_exp,GLC_exp);
dGLCspline = fnder(GLCspline,1);
%
plot(t_exp,GLC_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(GLCspline,tspan),'r--',tspan,ppval(dGLCspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(GLCspline,tspan))])
% title('GLC')
%
% % SPLINE FRU
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
FRUspline = spline(t_exp,FRU_exp);
dFRUspline = fnder(FRUspline,1);
%
plot(t_exp,FRU_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(FRUspline,tspan),'r--',tspan,ppval(dFRUspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(FRUspline,tspan))])
% title('FRU')

% % SPLINE G6P
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
G6Pspline = spline(t_exp,G6P_exp);
dG6Pspline = fnder(G6Pspline,1);
%
plot(t_exp,G6P_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(G6Pspline,tspan),'r--',tspan,ppval(dG6Pspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(G6Pspline,tspan))])
% title('G6P')

```

```

%
% % SPLINE F6P
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
F6Pspline = spline(t_exp,F6P_exp);
dF6Pspline = fnder(F6Pspline,1);
%
plot(t_exp,F6P_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(F6Pspline,tspan),'r--',tspan,ppval(dF6Pspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(F6Pspline,tspan))])
% title('f6P')
%
% % SPLINE PYR
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
PYRspline = spline(t_exp,PYR_exp);
dPYRspline = fnder(PYRspline,1);
%
plot(t_exp,PYR_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(PYRspline,tspan),'r--',tspan,ppval(dPYRspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(PYRspline,tspan))])
% title('PYR')
%
% % SPLINE R5P
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
R5Pspline = spline(t_exp,R5P_exp);
dR5Pspline = fnder(R5Pspline,1);
%
plot(t_exp,R5P_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(R5Pspline,tspan),'r--',tspan,ppval(dR5Pspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(R5Pspline,tspan))])
% title('R5P')
%
% % SPLINE E4P
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
E4Pspline = spline(t_exp,E4P_exp);
dE4Pspline = fnder(E4Pspline,1);
%
plot(t_exp,E4P_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(E4Pspline,tspan),'r--',tspan,ppval(dE4Pspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(E4Pspline,tspan))])
% title('E4P')
%
% % SPLINE aKT
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
aKTspline = spline(t_exp,aKT_exp);
daKTspline = fnder(aKTspline,1);
%
plot(t_exp,aKT_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(aKTspline,tspan),'r--',tspan,ppval(daKTspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(aKTspline,tspan))])
% title('aKT')

```



```

%
% % SPLINE SUCC
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
SUCCspline = spline(t_exp,SUCC_exp);
dSUCCspline = fnder(SUCCspline,1);
%
plot(t_exp,SUCC_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(SUCC
spline,tspan),'r--',tspan,ppval(dSUCCspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(SUCCspline,tspan))])
% title('SUCC')
%
% % SPLINE FUM
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
FUMspline = spline(t_exp,FUM_exp);
dFUMspline = fnder(FUMspline,1);
%
plot(t_exp,FUM_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(FUMsp
line,tspan),'r--',tspan,ppval(dFUMspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(FUMspline,tspan))])
% title('FUM')
%
% % SPLINE MAL
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
MALspline = spline(t_exp,MAL_exp);
dMALspline = fnder(MALspline,1);
%
plot(t_exp,MAL_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(MALsp
line,tspan),'r--',tspan,ppval(dMALspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(MALspline,tspan))])
% title('MAL')
%
% % SPLINE ATP
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
ATPspline = spline(t_exp,ATP_exp);
dATPspline = fnder(ATPspline,1);
%
plot(t_exp,ATP_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(ATPsp
line,tspan),'r--',tspan,ppval(dATPspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(ATPspline,tspan))])
% title('ATP')
%
% % SPLINE ADP
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
ADPspline = spline(t_exp,ADP_exp);
dADPspline = fnder(ADPspline,1);
%
plot(t_exp,ADP_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(ADPsp
line,tspan),'r--',tspan,ppval(dADPspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(ADPspline,tspan))])
% title('ADP')

```

```

%
% % SPLINE AMP
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
AMPspline = spline(t_exp,AMP_exp);
dAMPspline = fnder(AMPspline,1);
%
plot(t_exp,AMP_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(AMPspline,tspan),'r--',tspan,ppval(dAMPspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(AMPspline,tspan))])
% title('AMP')
%
% % SPLINE NADPH
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
NADPHspline = spline(t_exp,NADPH_exp);
dNADPHspline = fnder(NADPHspline,1);
%
plot(t_exp,NADPH_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(NADPHspline,tspan),'r--',tspan,ppval(dNADPHspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(NADPHspline,tspan))])
% title('NADPH')
%
% % SPLINE X intra
% i = i+1;
% subplot(a,b,i)
global Xspline dXspline
Xspline = spline(t_exp,X_exp);
dXspline = fnder(Xspline,1);
%
plot(t_exp,X_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b',tspan,ppval(Xspline,tspan),'r--',tspan,ppval(dXspline,tspan),'m-')
% axis([0,t(end),0,1.2*max(ppval(Xspline,tspan))])
% title('X intra')
% %

%
% global Xintraspline
% Xintraspline = spline(t_exp,Xintra_exp);
% dXintraspline = fnder(Xintraspline,1);
%

global Vmax Km Km2 Km3 Km4 alpha
alpha = 0.006;

% PARAMETRES EXTRACELLULAIRES
Vmax(1) = 71.4953 ; Km(1) = 0; % R01 : E_NO3 = NO3 ---
IDENTIFIED
Vmax(2)= 71.9309; Km(2) = 0; % R02 : E_NH4 = NH4 ---
IDENTIFIED
Vmax(3) = 4.9791 ; Km(3) = 0; % R03 : E_Pi = Pi ---
IDENTIFIED
Vmax(4) = 280 ; Km(4) = 9000; % R04 : E_SUC = E_GLC +
E_FRU --- ASSUMPTION (NB: rhydro_max between 200 and 500)

```

```

Vmax(5) = 124.8746 ; Km(5) = 0;                                % R05 : E_SUC = SUC ---
IDENTIFIED
Vmax(6) = 118.8311 ; Km(6) = 0;                                % R06 : E_GLC = GLC ---
IDENTIFIED
Vmax(7) = 63.9996 ; Km(7) = 0;                                % R07 : E_FRU = FRU ---
IDENTIFIED

% PARAMETRES INTRACELLULAIRES
Vmax(8) = 131.2792; Km(8) = 0.1000;                            % R08 : SUC = GLU + FRU ---
IDENTIFIED
Vmax(9) = 239.3297; Km(9) = 0.7000;                            % R09 : GLC + ATP = G6P + ADP ---
IDENTIFIED
Vmax(10) = 189.6204 ; Km(10) = 0.2000;                        % R10 : FRU + ATP = F6P + ADP ---
IDENTIFIED
Vmax(11) = 99 ; Km(11) = 0.01;                                % R11 : G6P = F6P
Vmax(12) = 307 ; Km(12) = 0.0050;                            % R12 : F6P + ATP = ADP + 2 T3P
Vmax(13) = 549 - 77; Km(13) = 0.010;                        % R13 : T3P + NAD + Pi + 2 ADP
= PYR + NADH + 2 ATP + H
Vmax(14) = 24.5; Km(14) = 0.0150;                            % R14 : G6P + 2 NADP = R5P + 2
NADPH + CO2 + 2 H+
Vmax(15) = 5.852; Km(15) = 0.000;                            % R15 : 2 R5P = F6P + E4P
Vmax(16) = .98 ; Km(16) = 0.010;                            % R16 : 3 R5P = 2 F6P + T3P
Vmax(17) = 470 ; Km(17) = 0.0010;                            % R17 : PYR + NAD + CoaSH = CO2 +
NADH + ACoA
Vmax(18) = 401; Km(18) = 0.0015; % R18 : AcoA + OXA + NAD = NADH + aKT + 2CO2
Vmax(19) = 369 ; Km(19) = 0.0100;                            % R19 : aKT + NAD + ADP + Pi =
SUCC + NADH + ATP + CO2
Vmax(20) = 402 ; Km(20) = 0.0050;                            % R20 : SUCC + FAD = FUM + FADH2
Vmax(21) = 438 ; Km(21) = 0.0050;                            % R21 : FUM + H2O = MAL
Vmax(22) = 381 ; Km(22) = 0.0500;                            % R22 : MAL + NAD = OXA + NADH + H+
Vmax(23) = 78 ; Km(23) = 0.10;                               % R23 : T3P + CO2 + ATP = OXA + Pi +
ADP
Vmax(24) = 86 ; Km(24) = 16;                                % R24 : NO3 + NADH + 3 NADPH = NH4 + NAD
+ 3 NADP --- IDENTIFIED
Vmax(25) = 830; % R25 : 2.5 ADP + 2.5 Pi + NADH + E_O2 = 2.5 ATP + NAD
Vmax(26) = 310 ; Km(26) = 0.2; Km2(26) = 0.008; Km3(26) = 0.008; % R26 :
synthese X
% Vmax(26) = 390; Km(26) = 0.10; Km2(26) = 0.010; Km3(26) = 0.010; % R26 :
synthese X
Vmax(27) = 10 ; Km(27) = 0.0010;                            % R27 : synthese NUC (R5P)
Vmax(28) = 117 ; Km(28) = 0.01;                            % R28 : synthese AA
Vmax(29) = 111 ; Km(29) = 0.0010;                            % R29 : synthese STH (G6P)
Vmax(30) = 4.5; Km(30) = 0.0010;                            % R30 : synthese STA (G6P)
Vmax(31) = 5.5 ; Km(31) = 0.0010;                            % R31 : synthese LIP (ACOA)

% % % PARAMETERS IDENTIFICATION
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%
% % %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% % % EXTRACELLULAIRES
% % % E_NO3, E_NH4, E_Pi, E_SUC, E_GLC, E_FRU %%%%%%%%%
param_extra0 = [100;100;100;100;100;100];
[param_extra,fval] = fminsearch(@minim_extra,param_extra0)
Vmax(1) = param_extra(1);

```

```

Vmax(2) = param_extra(2);
Vmax(3) = param_extra(3);
Vmax(5) = param_extra(4);
Vmax(6) = param_extra(5);
Vmax(7) = param_extra(6);
%
% % % % % POOLS %%%%%%%%%%
% param_pools0 = [6;3;150;6;6];
% [param_pools,fval] = fminsearch(@minim_pools,param_pools0)
% param_pools
% Vmax(27) = param_pools(1) ; Km(27) = 0.0010;           % R27 : synthese NUC
(R5P)
% % % % % % % % % % Vmax(28) = param_pools(2) ; Km(28) = 5;           %
R28 : synthese AA
% Vmax(29) = param_pools(3) ; Km(29) = 0.0010;           % R29 : synthese STH
(G6P)
% Vmax(30) = param_pools(4); Km(30) = 0.0010;           % R30 : synthese STA
(G6P)
% Vmax(31) = param_pools(5) ; Km(31) = 0.0010;           % R31 : synthese LIP
(ACOA)
% % % %%%%%%%%%%
%
% % %%%%%%%%%%
% % NO3, NH4 %%%%%%%%%%
% param_azote0 = [10];
% [param_azote,fval] = fminsearch(@minim_azote,param_azote0);
% param_azote
% % Km(24) = param_azote(1);
% Vmax(28) = param_azote(1); %% TRRTTAA synthesis
% % % %%%%%%%%%%
%
% % %%%%%%%%%%
% % % SUGARS : SUC, GLU, FRU %%%
param_sugars0 = [100;100;100];
[param_sugars,fval] = fminsearch(@minim_sugars,param_sugars0);
param_sugars
Vmax(8) = param_sugars(1);   % R08 : SUC = GLU + FRU --- IDENTIFIED
Vmax(9) = param_sugars(2);   % R09 : GLC + ATP = G6P + ADP --- IDENTIFIED
Vmax(10) = param_sugars(3);  % R10 : FRU + ATP = F6P + ADP --- IDENTIFIED
% %%%%%%%%%%5
%
% % %%%%%%%%%%
% % % % GLYCOLYSE G6P + F6P %%%%%%%%%%

% param_glyco0 = [0.1];
% % %
% % LB = [1 .001]; UB = [500 5];
% % [param_glyco,fval] =
fmincon(@minim_glyco,param_glyco0,[],[],[],[],LB,UB,[],[])
% % %
% [param_glyco,fval] = fminsearch(@minim_glyco,param_glyco0);
% param_glyco
% % %
% % Vmax(12) = param_glyco(1); % R12 : F6P + ATP = ADP + 2 T3P
% Vmax(15) = param_glyco(1); % R15 : 2 R5P = F6P + E4P

```

```
% Km(15) = param_glyco(1); % R15 : 2 R5P = F6P + E4P
% % Vmax(14) = param_glyco(2); % R14 : G6P + 2 NADP = R5P + 2 NADPH + CO2 +
2 H+
% % Vmax(16) = param_glyco(4);
% % Vmax(11) = param_glyco(5); % R11 : G6P = F6P
% % % %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% % % %
% % % % %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% % % % %% DOWN GLYCOLYSE : T3P + PYR %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% param_glyco_down0 = [100;100];
% [param_glyco_down,fval] = fminsearch(@minim_glyco_down,param_glyco_down0);
% % param_glyco_down
% Vmax(13) = param_glyco_down(1); % R13 : T3P + NAD + Pi + 2 ADP = PYR + NADH
+ 2 ATP + H
% Vmax(17) = param_glyco_down(2); % R17 : PYR + NAD + CoaSH = CO2 + NADH +
ACoA
%
% % % % % % %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% % %
% % % %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% % %% TCA CYCLE : AKT / ACOA / SUCC / FUM / MAL %%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% param_TCA0 = [500;500];
% [param_TCA,fval] = fminsearch(@minim_TCA,param_TCA0)
% % Vmax(18) = param_TCA(1);
% % Vmax(19) = param_TCA(2);
% Vmax(20) = param_TCA(1);
% Vmax(21) = param_TCA(4);
% Vmax(22) = param_TCA(2);
% %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%
% param0 = [30];
% LB = [0.001 ]; UB = [10];
% [param,fval] = fmincon(@minim,param0,[],[],[],[],LB,UB);
% % [param,fval] = fminsearch(@minim,param0)
% param
% % % % % % % % % % % % % % % % BIOMASSE %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Vmax(26) = param(1);
% % % % Km(28) = param(2);
% % % % % Km2(28) = param(2) ;
% % % Km3(28) = param(3);

%
% % Vmax(12) = param_R2(7); % R12 :F6P + ATP = ADP + 2 T3P
% % Km(12) = param_R2(8);
% % % %
% % % Matrice Fischer
% % intl = - X_exp;
% % intl = pas.*(intl(1:end-1) + intl(2:end))/2;
% % % %
% % phi = intl;
% % M = phi'*phi;
% % n = 10;
% % sigma_N = sqrt(fval./n);
% % invM=inv(M);
% %
```

```

% % % %
% Confidence95_Vmax = [Vmax(1) - 1.96.*sigma_N.*invM, Vmax(1),Vmax(1) +
1.96.*sigma_N.*invM]
param=[Vmax',Km'];
xlswrite('paramaters_article.xlsx',param,1,'B2')
%% ODE SIMULATION %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% load parametres.txt
% param = parametres

sizeN=size(N);
S=sizeN(2);
R=sizeN(1);

n0 =
[datas_controle(1,4:10)'.*V_exp(1);datas_controle(1,11:end)'.*X_exp(1);X_exp(1)
];datas_controle_manquantes(1,:)'.*X_exp(1);V_exp(1)]; % 7 extra + 23 intra +
.. manqu + X + V =      + S-1-23
splines =
[E_NO3spline;E_NH4spline;E_Pispline;E_O2spline;E_SUCspline;E_GLCspline;E_FRUspline;
NO3spline;NH4spline;Pispline;SUCspline;GLCspline;FRUspline;G6Pspline;F6Pspline;
PYRspline;R5Pspline;E4Pspline;aKTspline;SUCCspline;FUMspline;MALspline;ATPspline;
ADPspline;AMPspline;NADPHspline;Xspline];
dsplines =
[dE_NO3spline;dE_NH4spline;dE_Pispline;dE_O2spline;dE_SUCspline;dE_GLCspline;dE_FRUspline;
dNO3spline;dNH4spline;dPispline;dSUCspline;dGLCspline;dFRUspline;dG6Pspline;dF6Pspline;
dPYRspline;dR5Pspline;dE4Pspline;daKTspline;dSUCCspline;dFUMspline;dMALspline;dATPspline;
dADPspline;dAMPspline;dNADPHspline;dXspline];
[t,y] = ode15s(@equadiff,tspan,n0,[],N,splines);

X = y(:,27); % Biomasse
V = y(:,end); % Volume

E_NO3 = y(:,1)./V;
E_NH4 = y(:,2)./V;
E_Pi = y(:,3)./V;
E_O2 = y(:,4)./V;
E_SUC = y(:,5)./V;
E_GLC = y(:,6)./V;
E_FRU = y(:,7)./V;

NO3 = y(:,8)./X;
NH4 = y(:,9)./X;
Pi = y(:,10)./X;
SUC = y(:,11)./X;
GLC = y(:,12)./X;
FRU = y(:,13)./X;
G6P = y(:,14)./X;
F6P = y(:,15)./X;
PYR = y(:,16)./X;
R5P = y(:,17)./X;
E4P = y(:,18)./X;
aKT = y(:,19)./X;
SUCC = y(:,20)./X;
FUM = y(:,21)./X;

```

```

MAL = y(:,22)./X;
ATP = y(:,23)./X;
ADP = y(:,24)./X;
AMP = y(:,25)./X;
NADPH = y(:,26)./X;

T3P = y(:,28)./X;
ACOA = y(:,29)./X;
OXA = y(:,30)./X;
NAD = y(:,31)./X;
NADH = y(:,32)./X;
NADP = y(:,33)./X;
PPi = y(:,34)./X;
NUC = y(:,35)./X;
AA = y(:,36)./X;
STH = y(:,37)./X;
STA = y(:,38)./X;
LIP = y(:,39)./X;
CO2 = y(:,40)./X;

% v5 = Vmax(5);
% v8 = Vmax(8)*SUC./(SUC+Km(8));
% muc = 0.108.*SUC;

% figure(878)
% plot(t,v5-v8-muc,'g')
% % plot(t,v5-v8-muc,'b')
% % legend('E_SUC -> SUC','SUC = GLC + FRU')

dydt = zeros(length(t),S+1);
for i = 1:length(t)
dydt(i,:) = equadiff(t(i),y(i,:)','N,splines);
end

dV = dydt(:,S+1);
dE_NO3 = (dydt(:,1)-E_NO3.*dV)./V;
dE_NH4 = (dydt(:,2)-E_NH4.*dV)./V;
dE_Pi = (dydt(:,3)-E_Pi.*dV)./V;
dE_O2 = (dydt(:,4)-E_O2.*dV)./V;
dE_SUC = (dydt(:,5)-E_SUC.*dV)./V;
dE_GLC = (dydt(:,6)-E_GLC.*dV)./V;
dE_FRU = (dydt(:,7)-E_FRU.*dV)./V;

dX = dydt(:,27);
dNO3 = (dydt(:,8)-NO3.*dX)./X;
dNH4 = (dydt(:,9)-NH4.*dX)./X;
dPi = (dydt(:,10)-Pi.*dX)./X;
dSUC = (dydt(:,11)-SUC.*dX)./X;
dGLC = (dydt(:,12)-GLC.*dX)./X;
dFRU = (dydt(:,13)-FRU.*dX)./X;
dG6P = (dydt(:,14)-G6P.*dX)./X;
dF6P = (dydt(:,15)-F6P.*dX)./X;
dPYR = (dydt(:,16)-PYR.*dX)./X;
dR5P = (dydt(:,17)-R5P.*dX)./X;

```

```

dE4P = (dydt(:,18)-E4P.*dX)./X;
daKT = (dydt(:,19)-aKT.*dX)./X;
dSUCC = (dydt(:,20)-SUCC.*dX)./X;
dFUM = (dydt(:,21)-FUM.*dX)./X;
dMAL = (dydt(:,22)-MAL.*dX)./X;
dATP = (dydt(:,23)-ATP.*dX)./X;
dADP = (dydt(:,24)-ADP.*dX)./X;
dAMP = (dydt(:,25)-AMP.*dX)./X;
dNADPH = (dydt(:,26)-NADPH.*dX)./X;

```

```

dT3P = (dydt(:,28)-T3P.*dX)./X;
dACOA = (dydt(:,29)-ACOA.*dX)./X;
dOXA = (dydt(:,30)-OXA.*dX)./X;
dNAD = (dydt(:,31)-NAD.*dX)./X;
dNADH = (dydt(:,32)-NADH.*dX)./X;
dNADP = (dydt(:,33)-NADP.*dX)./X;
dPPi = (dydt(:,34)-PPi.*dX)./X;
dNUC = (dydt(:,35)-NUC.*dX)./X;
dAA = (dydt(:,36)-AA.*dX)./X;
dSTH = (dydt(:,37)-STH.*dX)./X;
dSTA = (dydt(:,38)-STA.*dX)./X;
dLIP = (dydt(:,39)-LIP.*dX)./X;
dCO2 = (dydt(:,40)-CO2.*dX)./X;

```

```

%%% FLUX

```

```

r = [Vmax(1).*ones(1,Nb_points);
% R01 : E_NO3 = NO3
      Vmax(2).*ones(1,Nb_points);
% R02 : E_NH4 = NH4
      Vmax(3).*ones(1,Nb_points);
% R03 : E_Pi = Pi
      Vmax(4).*(E_SUC'./(E_SUC' + Km(4))); % R04 :
E_SUC = E_GLU + E_FRU
      Vmax(5).*ones(1,Nb_points) ;
% R05 : E_SUC = SUC
      Vmax(6).*ones(1,Nb_points) ;
% R06 : E_GLC = GLC
      Vmax(7).*ones(1,Nb_points) ;
% R07 : E_FRU = FRU
      Vmax(8).*(SUC'./(Km(8)+SUC')) ; % R08 :
SUC = GLU + FRU
      Vmax(9).*(GLC'./(Km(9)+GLC')) ; % R09 :
GLC + ATP = G6P + ADP
      Vmax(10).*(FRU'./(Km(10)+FRU')) ; % R10 :
FRU + ATP = F6P + ADP
      Vmax(11).*(G6P'./(Km(11)+G6P')) ; % R11 :
G6P = F6P
      Vmax(12).*(F6P'./(Km(12)+F6P')) ; % R12 :
F6P + ATP = ADP + 2 T3P
      Vmax(13).*(T3P'./(Km(13)+T3P')) ; % R13 :
T3P + NAD + Pi + 2 ADP = PYR + NADH + 2 ATP + H
      Vmax(14).*(G6P'./(Km(14)+G6P')) ; % R14 :
G6P + 2 NADP = R5P + 2 NADPH + CO2 + 2 H+

```



```

    Vmax(15).*R5P'./(Km(15)+R5P'); % R15 :
2 R5P = F6P + E4P
    Vmax(16).*R5P'./(Km(16)+R5P'); % R16 :
3 R5P = 2 F6P + T3P
    Vmax(17).*PYR'./(Km(17)+PYR'); % R17 :
PYR + NAD + CoaSH = CO2 + NADH + ACoA
    Vmax(18).*ACOA'./(Km(18)+ACOA'); % R18 :
AcoA + OXA + NAD = NADH + aKT + 2CO2
    Vmax(19).*aKT'./(Km(19)+aKT'); % R19 :
aKT + NAD + ADP + Pi = SUCC + NADH + ATP + CO2
    Vmax(20).*SUCC'./(Km(20)+SUCC'); % R20 :
SUCC + FAD = FUM + FADH2
    Vmax(21).*FUM'./(Km(21)+FUM'); % R21 :
FUM + H2O = MAL
    Vmax(22).*MAL'./(Km(22)+MAL'); % R22 :
MAL + NAD = OXA + NADH + H+
    Vmax(23).*T3P'./(Km(23)+T3P'); % R23 :
T3P + CO2 + ATP = OXA + Pi + ADP
    Vmax(24).*NO3'./(Km(24)+NO3'); % R24 :
NO3 + NADH + 3 NADPH = NH4 + NAD + 3 NADP
    Vmax(25).*ones(1,Nb_points); % R25 :
2.5 ADP + 2.5 Pi + NADH + E_O2 = 2.5 ATP + NAD

Vmax(26).*(G6P'./(Km(26)+G6P')).^2.*PYR'./(Km2(26)+PYR').*R5P'./(Km3(26)+R5P')
; % R26 : X synthesis reactifs (en mol/gFW)
    Vmax(27).*R5P'./(Km(27)+R5P'); % R27 :
NUC synthesis
    Vmax(28).*NH4'./(Km(28)+NH4'); % R28 :
AA synthesis
    Vmax(29).*G6P'./(Km(29)+G6P'); % R29 :
STH synthesis
    Vmax(30).*G6P'./(Km(30)+G6P'); % R30 :
STA synthesis
    Vmax(31).*ACOA'./(Km(31)+ACOA'); % R31 :
LIP synthesis
];

fig_flux= figure('Name','Flux (umol/gFW/d)','NumberTitle','off'); %
CONCENTRATIONS;
flux_number = 1:R;
set(fig_flux,'units','normalized','outerposition',[0 0 1 1]);
for i = 1:R
subplot(5,7,i)
plot(t(2:end),r(i,2:end),'b')
axis tight
axis([0,t(end),0.95.*min(r(i,:)),1.05.*max(r(i,:))])
% M = max(max([flux_C(:,i),flux_AS(:,i)]));
grid on
str=sprintf('R%d', flux_number(i));
title(str)
end

i=0;
a=3;b=5;
fig_test= figure('Name','ratios','NumberTitle','off'); % CONCENTRATIONS;

```

```

set(fig_test,'units','normalized','outerposition',[0 0 1 1]);
i=i+1;
subplot(a,b,i)
plot(t,r(26,:).*1e-6.*293.9.*10,'k')
axis([0,t(end),0,0.4])
% axis tight
title('mu (day-1)')

i=i+1;
subplot(a,b,i)
plot(t,100.*(r(14,:))./(r(11,:)+r(14,:)),'b')
axis([0,t(end),0,100])
title('% C vers PPP')

i=i+1;
subplot(a,b,i)
pas_sim = tspan(2:end)-tspan(1:end-1);
flux_nutrients_IN =
(r(1,:).*62+r(2,:).*16+r(3,:).*96+r(5,:).*342+r(6,:).*180+r(7,:).*180).*X'./100
0; % en mg/jour
nutrients_IN = pas_sim.*(flux_nutrients_IN(1:end-1) +
flux_nutrients_IN(2:end))/2;
nutrients_IN = 0 + [0, cumsum(nutrients_IN)];

plot(t,nutrients_IN,'b')
axis tight
title('nutrients IN (mg)')

%
% subplot(5,8,R+3)
% plot(t,r(33,:))./(r(9,:)+r(10,:)),'b')
% axis([0,t(end),0,1])
% title('LIP/GLYCOLYSIS')

qCO2 = r(14,:) + 2.*r(18,:) + r(19,:) - r(23,:) - 0.62.*r(27,:);
qO2 = r(25,:);
RQ = qCO2./qO2;

i=i+1;
qCO2_pdt = r(14,:) + 2.*r(18,:) + r(19,:);
subplot(a,b,i)
plot(t,qCO2./24,'b')
axis tight
title('qCO2 pdt (umol/gFW/h)')

i=i+1;
subplot(a,b,i)
plot(t(2:end),RQ(2:end),'b')
axis tight
% axis([0,t(end),0,1])
title('RQ')

```

```

i=i+1;
subplot(a,b,i)
plot(t,100.*r(13,:)./(r(23,:)+r(13,:)+r(31,:)), 'b')
axis([0,6,0,1])
title('% T3P vers OXA')

i=i+1;
subplot(a,b,i)
plot(t,r(13,:)+r(17,:)+r(18,:)+r(19,:)+r(22,:), 'b', t,r(24,:) + 0.24.*r(28,:) +
r(25,:), 'b')
axis tight
title('r NADH produit / conso')

i=i+1;
subplot(a,b,i)
fluxATP = (2.5.*r(25,:) + 2.*r(13,:) + r(19,:)).*X';
pas_sim = tspan(2:end)-tspan(1:end-1);
ATP_pdt = pas_sim.*(fluxATP(1:end-1) + fluxATP(2:end))/2;
nATP = ATP.*X;
ATP_glyco_tca = nATP(1) + [0, cumsum(ATP_pdt)];

plot(t,ATP_glyco_tca, 'b')
axis tight
title('ATP via GLYCO + TCA + oxphos(umol)')

i=i+1;
subplot(a,b,i)
fluxATP_oxphos = 2.5.*r(25,:).*X';
pas_sim = tspan(2:end)-tspan(1:end-1);
ATP_pdt = pas_sim.*(fluxATP_oxphos(1:end-1) + fluxATP_oxphos(2:end))/2;
nATP = ATP.*X;
ATP_OXPHOS = nATP(1) + [0, cumsum(ATP_pdt)];

plot(t,ATP_OXPHOS, 'b')
axis tight
title('ATP via OXPHOS (umol)')

i=i+1;
subplot(a,b,i)
Y_ATP_X = 0.015;
plot(t,fluxATP./1000000, 'b', t,Y_ATP_X.*dX, 'g')
axis tight
title('flux ATP / flux X')

dATPplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dATPspline,tspan), 'm-', tspan(2:end), dATP(2:end), 'r-');
axis tight; grid on;
title('dATP')
i = i+1;

plotATP= subplot(a,b,i); % Intra ATP
plot(t,ATP, 'b')
axis tight

```

```

title('ATP')
i=i+1;
% %
dNADHplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dNADPHspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dNADPH(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dNADPH')
i = i+1;

plotNADH = subplot(a,b,i); % Intra NADH
plot(t,NADH,'b')
axis([0,t(end),0,1.1*max(NADH)])
title('NADH')
i=i+1;

flux = r';
xlswrite('simulations_flux_article.xls',flux,1,'A2')

%%%%%%%% SPLINES COMPARAISONS %%%%%%%%%
a = 4;
b = 8;
i = 1;
%
% fig_test = figure(200)
% set(fig_test,'units','normalized','outerposition',[0 0 1 1]);
%
plot(tspan,(ppval(dE_GLCspline,tspan)+ppval(dE_FRUspline,tspan))./ppval(Xspline,tspan),'m-',tspan,(dE_GLC+dE_FRU)./X,'r-');
% axis tight; grid on;

fig_dSdt= figure('Name','dC/dt','NumberTitle','off'); % dC/dt;
set(fig_dSdt,'units','normalized','outerposition',[0 0 1 1]);

dE_NO3plot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dE_NO3spline,tspan),'m-',tspan(2:end),dE_NO3(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dE_NO3')
i = i+1;

dE_NH4plot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dE_NH4spline,tspan),'m-',tspan(2:end),dE_NH4(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dE_NH4')
i = i+1;

dE_Piplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dE_Pispline,tspan),'m-',tspan(2:end),dE_Pi(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dE_Pi')
i = i+1;

dXplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dXspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dX(2:end),'r-');

```

```

axis tight; grid on;
title('dx')
i = i+1;

dE_SUCplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dE_SUCspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dE_SUC(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dE_SUC')
i = i+1;

dE_GLCplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dE_GLCspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dE_GLC(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dE_GLC')
i = i+1;

dE_FRUplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dE_FRUspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dE_FRU(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dE_FRU')
i = i+2;

dNO3plot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dNO3spline,tspan),'m-',tspan(2:end),dNO3(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dNO3')
i = i+1;

dNH4plot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dNH4spline,tspan),'m-',tspan(2:end),dNH4(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dNH4')
i = i+1;

dPipplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dPispline,tspan),'m-',tspan(2:end),dPi(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dPi')
i = i+1;

dSUCplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dSUCspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dSUC(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dSUC')
i = i+1;

dGLCplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dGLCspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dGLC(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dGLC')
i = i+1;

dFRUplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dFRUspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dFRU(2:end),'r-');

```

```

axis tight; grid on;
title('dFRU')
i = i+1;

dG6Pplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dG6Pspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dG6P(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dG6P')
i = i+1;

dF6Pplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dF6Pspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dF6P(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dF6P')
i = i+1;

dT3Pplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan(2:end),dT3P(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dT3P')
i = i+1;

dPYRplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dPYRspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dPYR(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dPYR')
i = i+1;

dR5Pplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dR5Pspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dR5P(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dR5P')
i = i+1;

dE4Pplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dE4Pspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dE4P(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dE4P')
i = i+1;

dACOAplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan(2:end),dACOA(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dACOA')
i = i+1;

daKTplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(daKTspline,tspan),'m-',tspan(2:end),daKT(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('daKT')
i = i+1;

```

```

dSUCCplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dSUCCspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dSUCC(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dSUCC')
i = i+1;

dFUMplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dFUMspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dFUM(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dFUM')
i = i+1;

dMALplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dMALspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dMAL(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dMAL')
i = i+1;

% dATPplot = subplot(a,b,i);
% plot(tspan,ppval(dATPspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dATP(2:end),'r-');
% axis tight; grid on;
% title('dATP')
% i = i+1;
%
% dADPplot = subplot(a,b,i);
% plot(tspan,ppval(dADPspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dADP(2:end),'r-');
% axis tight; grid on;
% title('dADP')
% i = i+1;
%
% dAMPplot = subplot(a,b,i);
% plot(tspan,ppval(dAMPspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dAMP(2:end),'r-');
% axis tight; grid on;
% title('dAMP')
% i = i+1;

dNADDPHplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dNADPHspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dNADPH(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dNADPH')
i = i+1;

dXplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan,ppval(dXspline,tspan),'m-',tspan(2:end),dX(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dX')
i = i+1;

dAAPlot = subplot(a,b,i);
plot(tspan(2:end),dAA(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dAA')
i = i+1;

```

```

dNADplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan(2:end),dNAD(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dNAD')
i = i+1;

dCO2plot = subplot(a,b,i);
plot(tspan(2:end),dCO2(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dCo2')
i = i+1;

dOXAplot = subplot(a,b,i);
plot(tspan(2:end),dOXA(2:end),'r-');
axis tight; grid on;
title('dOXA')
i = i+1;

%
% dXsplineplot = subplot(a,b,i);
% plot(tspan,ppval(dXspline,tspan),'m-',tspan,dXintra,'r-');
% axis tight
% title('dXintra')
% i = i+1;
%
%
%% RESULTS GRAPHS %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
i= 1;
a = 2;
b = 4;
figS = figure('Name','Concentrations CONTROLE','NumberTitle','off'); %
CONCENTRATIONS
set(figS,'units','normalized','outerposition',[0 0 1 1]);

subplot(a,b,i) % Extra NO3
% plot(t_exp,E_NO3_exp, '.')

n_E_NO3_exp = V_exp.*E_NO3_exp;
stdev_n_E_NO3_exp =
sqrt(stdev_V_exp.^2./V_exp.^2+stdev_E_NO3_exp.^2./E_NO3_exp.^2.*(n_E_NO3_exp).^2);
errorbar(t_exp,n_E_NO3_exp,stdev_n_E_NO3_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
hold on
plot(t,E_NO3.*V,'b')
% legend('d','dsd')
axis([0,t(end),0,1.1*max(E_NO3_exp.*V_exp)])
title('Ex NO3 (umol) (n = 10)')
% % xlabel('t (jours)')
% % ylabel('Ex NO3 (mM)')
i=i+1;
%

subplot(a,b,i) % Extra NH4

```



```

n_E_NH4_exp = V_exp.*E_NH4_exp;
% plot(t_exp,n_E_NH4_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
stdev_n_E_NH4_exp =
sqrt(stdev_V_exp.^2./V_exp.^2+stdev_E_NH4_exp.^2./E_NH4_exp.^2.*(n_E_NH4_exp).^2);
errorbar(t_exp,n_E_NH4_exp,stdev_n_E_NH4_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
hold on
plot(t,E_NH4.*V,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1.1*max(n_E_NH4_exp)])
title('Ex NH4 (umol) (n = 10)')
% % xlabel('t (jours)')
i=i+1;
%
subplot(a,b,i) % Extra Pi
n_E_Pi_exp = V_exp.*E_Pi_exp;
stdev_n_E_Pi_exp =
sqrt(stdev_V_exp.^2./V_exp.^2+stdev_E_Pi_exp.^2./E_Pi_exp.^2.*(n_E_Pi_exp).^2);
;
errorbar(t_exp,n_E_Pi_exp,stdev_n_E_Pi_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
% plot(t_exp,n_E_Pi_exp,'.')
hold on
plot(t,E_Pi.*V,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1.1*max(n_E_Pi_exp)])
title('Ex Pi (umol) (n = 10)')
% % xlabel('t (jours)')
i=i+1;
%
% subplot(a,b,i) % Extra O2
% % % plot(t_exp,E_O2_exp,'.')
% n_E_O2_exp = V_exp.*E_O2_exp;
% % errorbar(t_exp,E_O2_exp,stdev_E_O2_exp,'rs:')
% plot(t_exp,n_E_O2_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
% hold on
% plot(t,E_O2,'b')
% hold off
% axis([0,t(end),0,1.1*max(n_E_O2_exp)])
% title('n Ex O_2 (umol)')
% % % xlabel('t (jours)')
% % ylabel('O2 (mM)')
% i=i+1;
% %
subplot(a,b,i) % Extra SAC
n_E_SUC_exp = V_exp.*E_SUC_exp;
plot(t_exp,n_E_SUC_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
% errorbar(t_exp,n_E_SUC_exp,stdev_E_SUC_exp,'rs:')
hold on
plot(t,E_SUC.*V,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1.1*max(n_E_SUC_exp)])
title('Ex SUC (umol) (n = 1)')
% xlabel('t (jours)')

```

```

% ylabel('SAC (mM)')
i=i+1;
%
subplot(a,b,i) % Extra GLC
n_E_GLC_exp = V_exp.*E_GLC_exp;
plot(t_exp,n_E_GLC_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b','MarkerEdgeCo
lor','b')
% errorbar(t_exp,n_E_GLC_exp,stdev_E_GLC_exp,'rs:')
hold on
plot(t,E_GLC.*V,'b')
axis([0,t(end),0,1500])

hold off
title('Ex GLC (umol) (n = 1)')
% % xlabel('t (jours)')
% % ylabel('GLC (mM) (n = 1)')
i=i+1;
%
subplot(a,b,i) % Extra FRU
n_E_FRU_exp = V_exp.*E_FRU_exp;
% errorbar(t_exp,n_E_FRU_exp,stdev_E_FRU_exp,'rs:')
plot(t_exp,n_E_FRU_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
hold on
plot(t,E_FRU.*V,'b')
axis([0,t(end),0,1500])
hold off
title('Extra FRU (umol)')
% % xlabel('t (jours)')
% % ylabel('FRU ex (mM) (n = 1)')
i=i+1;

subplot(a,b,i) % biomasse
errorbar(t_exp,X_exp,stdev_X_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
% % plot(t_exp,X_exp,'.:')
hold on
plot(t,X,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1])
title('Biomasse A2.5')
% xlabel('t (jours)')
% ylabel('X (gFW) (n = 10)')

i=i+1;
%
subplot(a,b,i) % Volume
% plot(t_exp,V_exp,'k.')
errorbar(t_exp,V_exp,stdev_V_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
hold on
plot(t,V,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1.1*max(V)])
title('V media (L)')
% % xlabel('t (jours)')
% % ylabel('V (mL) (n = 10)')
i=i+1;

```

```

% errorbar(t_exp,n_E_FRU_exp,stdev_E_FRU_exp,'rs:')

% subplot(2,5,i) % Extra HYDRO
%
% vmax_sac = 12.18;
% Km_sac = 10;
% v_hydro_exp = vmax_sac*E_SUC_exp./(Km_sac + E_SUC_exp);
% plot(t,vmax_sac*(n_ex(:,5)./V)./(Km_sac + (n_ex(:,5)./V)), 'b')
% hold on
% plot(t_exp,v_hydro_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
% axis([0,t(end),0,1.5*max(v_hydro_exp)])
% hold off
% title('Extra FRU (umol)')
% % % xlabel('t (jours)')
% % % ylabel('FRU ex (mM)')
% i=i+1;
% %
%

figSintra = figure('Name','Concentrations intra','NumberTitle','off'); %
CONCENTRATIONS
set(figSintra,'units','normalized','outerposition',[0 0 1 1]);

%% INTRACELLULAIRES %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%55
a = 4;
b = 6;
i = 1;
NO3plot = subplot(a,b,i); % Intra NO3
errorbar(t_exp,NO3_exp,stdev_NO3_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b'
)
hold on
plot(t,NO3,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1.3*max(NO3_exp)])
title('NO3 (umol/gFW) (n = 2)')
i=i+1;
%
NH4plot = subplot(a,b,i); % Intra NH4
errorbar(t_exp,NH4_exp,stdev_NH4_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b'
)
hold on
plot(t,NH4,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1.3*max(NH4_exp)])
title('NH4 (n = 2)')
i=i+1;
%
plotPi = subplot(a,b,i); % Intra Pi
errorbar(t_exp,Pi_exp,stdev_Pi_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
hold on
plot(t,Pi,'b')
hold off

```

```

axis([0,t(end),0,1.1*max(Pi_exp)])
title('Pi (n = 2)')
i=i+1;
%
PlotSUC = subplot(a,b,i); % Intra SUC
errorbar(t_exp,SUC_exp,stdev_SUC_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b'
)
hold on
plot(t,SUC,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1.2*max(SUC_exp)])
title('SUC (n = 1)')
i=i+1;
%
plotGLC = subplot(a,b,i); % Intra GLC
errorbar(t_exp,GLC_exp,stdev_GLC_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b'
)
hold on
plot(t,GLC,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1.2*max(GLC_exp)])
title('GLC (n = 1)')
i=i+1;
%
plotFRU = subplot(a,b,i); % Intra FRU
errorbar(t_exp,FRU_exp,stdev_FRU_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b'
,'MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
hold on
plot(t,FRU,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1.2*max(FRU_exp)])
title('FRU (n = 1)')

i=i+1;
% %
plotG6P = subplot(a,b,i); % Intra G6P
errorbar(t_exp,G6P_exp,stdev_G6P_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b'
)
hold on
plot(t,G6P,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,2*max(G6P_exp)])
title('G6P (n = 4)')
i=i+1;
% %
% %
plotR5P = subplot(a,b,i); % Intra R5P
errorbar(t_exp,R5P_exp,stdev_R5P_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b'
)
hold on
plot(t,R5P,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1.5*max(R5P_exp)])
title('R5P (n = 4)')

```

```

i=i+1;

% %
plotE4P = subplot(a,b,i); % Intra E4P
errorbar(t_exp,E4P_exp,stdev_E4P_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b'
)
hold on
plot(t,E4P,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1.7*max(E4P_exp)])
title('E4P (n = 4)')
i=i+1;

plotF6P = subplot(a,b,i); % Intra F6P
errorbar(t_exp,F6P_exp,stdev_F6P_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b'
)
hold on
plot(t,F6P,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1.7*max(F6P_exp)])
title('F6P (n = 4)')
i=i+1;
% %
plotT3P = subplot(a,b,i); % Intra T3P
plot(t,T3P,'b')
axis([0,t(end),0,1.5*max(T3P)])
title('T3P')
i=i+1;
% %

plotPYR = subplot(a,b,i); % Intra PYR
errorbar(t_exp,PYR_exp,stdev_PYR_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b'
)
hold on
plot(t,PYR,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1.5*max(PYR_exp)])
title('PYR (n = 4)')
i=i+1;

% %
plotACOA = subplot(a,b,i); % Intra ACOA
plot(t,ACOA,'b')
axis([0,t(end),0,1.5*max(ACOA)])
title('AcoA')
i=i+1;

plotaKT = subplot(a,b,i); % Intra aKT
errorbar(t_exp,aKT_exp,stdev_aKT_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b'
)
hold on
plot(t,aKT,'b')

```

```

hold off
axis([0,t(end),0,2*max(aKT_exp)])
title('aKT (n = 4)')
i=i+1;
% %
plotSUCC = subplot(a,b,i); % Intra SUCC
errorbar(t_exp,SUCC_exp,stdev_SUCC_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
hold on
plot(t,SUCC,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1.3.*max(SUCC_exp)])
title('SUCC (n = 4)')
i=i+1;
% %
plotFUM= subplot(a,b,i); % Intra FUM
errorbar(t_exp,FUM_exp,stdev_FUM_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
hold on
plot(t,FUM,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,1.7*max(FUM_exp)])
title('FUM (n = 4)')
i=i+1;
% %
plotMAL= subplot(a,b,i); % Intra MAL
errorbar(t_exp,MAL_exp,stdev_MAL_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
hold on
plot(t,MAL,'b')
hold off
axis([0,t(end),0,2*max(MAL_exp)])
title('MAL (n = 4)')
i=i+1;

plotOXA = subplot(a,b,i); % Intra OXA
plot(t,OXA,'b')
axis([0,t(end),0,1.5*max(OXA)])
title('OXA')
i=i+1;
%
% plotATP= subplot(a,b,i); % Intra ATP
%
errorbar(t_exp,ATP_exp,stdev_ATP_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
% hold on
% plot(t,ATP,'b')
% hold off
% axis([0,t(end),0,1.5*max(ATP_exp)])
% title('ATP (n = 3)')
% i=i+1;
% % %
% plotADP= subplot(a,b,i); % Intra ADP

```

```

%
errorbar(t_exp,ADP_exp,stdev_ADP_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b'
)
% hold on
% plot(t,ADP,'b')
% hold off
% axis([0,t(end),0,1.5*max(ADP_exp)])
% title('ADP (n = 3)')
% i=i+1;
% % %
% plotAMP= subplot(a,b,i); % Intra AMP
%
errorbar(t_exp,AMP_exp,stdev_AMP_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b'
)
% hold on
% plot(t,AMP,'b')
% hold off
% axis([0,t(end),0,2*max(AMP_exp)])
% title('AMP (n = 3)')
% i=i+1;
% % %
% % plotNADPH = subplot(a,b,i); % Intra NADPH
% %
errorbar(t_exp,NADPH_exp,stdev_NADPH_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor'
,'b')
% % hold on
% % plot(t,NADPH,'b')
% % hold off
% % axis([0,t(end),0,1.5*max(NADPH_exp)])
% % title('NADPH (n = 3)')
% % i=i+1;
%
% plotNADP = subplot(a,b,i); % Intra NADP
% plot(t,NADP,'b')
% axis([0,t(end),0,1.1*max(NADP)])
% title('NADP')
% i=i+1;
%
% plotNADH = subplot(a,b,i); % Intra NADH
% plot(t,NADH,'b')
% axis([0,t(end),0,1.1*max(NADH)])
% title('NADH')
% i=i+1;
%
% plotNAD = subplot(a,b,i); % Intra NAD
% plot(t,NAD,'b')
% axis([0,t(end),0,1.1*max(NAD)])
% title('NAD')
% i=i+1;

plotAA = subplot(a,b,i); % Intra AA
plot(t,AA,'b')
axis([0,t(end),0,1.5*max(AA)])
title('AA')

```

```

i=i+1;

plotNUC = subplot(a,b,i); % Intra NUC
plot(t,NUC,'b')
axis([0,t(end),0,1.5*max(NUC)])
title('NUC')
i=i+1;

plotSTA = subplot(a,b,i); % Intra STA
plot(t,STA,'b')
axis([0,t(end),0,1.5*max(STA)])
title('STA')
i=i+1;

plotSTH = subplot(a,b,i); % Intra STH
plot(t,STH,'b')
axis([0,t(end),0,1.5*max(STH)])
title('STH')
i=i+1;

plotLIP = subplot(a,b,i); % Intra LIP
plot(t,LIP,'b')
axis([0,t(end),0,1.5*max(LIP)])
title('LIP')
i=i+1;

plotCO2 = subplot(a,b,i); % Intra LIP
plot(t,CO2,'b')
axis([0,t(end),0,1.5*max(CO2)])
title('CO2')
i=i+1;

% plotPPi = subplot(a,b,i); % Intra NUC
% plot(t,PPi,'b')
% axis([0,t(end),0,1.5*max(PPi)])
% title('PPi')
% i=i+1;

% plotratioNAD = subplot(a,b,i); % Intra X intra
% %
errorbar(t_exp,Xintra_exp,stdev_X_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
% plot(t,NADH./(NADH+NAD),'m')
% axis([0,t(end),0,1])
% title('NADH/(NAD+NADH)')
% i=i+1;
% %
% plotratioNADP = subplot(a,b,i); % Intra X intra
% %
errorbar(t_exp,Xintra_exp,stdev_X_exp,'bs','MarkerSize',2,'MarkerFaceColor','b')
% plot(t,NADPH./(NADPH+NADP),'m')
% axis([0,t(end),0,1])
% title('NADPH/(NADPH+NADP)')

```



```

% legend('controle')
% i=i+1;

simu_controle =
[E_NO3,E_NH4,E_Pi,E_O2,E_SUC,E_GLC,E_FRU,NO3,NH4,Pi,SUC,GLC,FRU,G6P,F6P,PYR,R5
P,E4P,aKT,SUCC,FUM,MAL,ATP,ADP,AMP,NADPH,X,T3P,ACOA,OXA,NAD,NADH,NADP,PPi,NUC,
AA,CO2,V,t];
% % fid = fopen('test.txt','w');
% % fprintf(fid, '%i\n', [E_NO3,E_NO3]);

xlswrite('concentrations_article.xls',simu_controle,1,'A2');

toc

```

Fichier equadiff.m

```

function dydt = equadiff(t,y,N,splines)

% PARAMETERS %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
global Vmax Km Km2 Km3 Km4 alpha

% STATES %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
V = y(end);

E_NO3 = y(1)./V;
E_NH4 = y(2)./V;
E_Pi = y(3)./V;
E_O2 = y(4)./V;
E_SUC = y(5)./V;
E_GLC = y(6)./V;
E_FRU = y(7)./V;

% E_NO3 = PPVal(splines(1),t);
% E_NH4 = PPVal(splines(2),t);
% E_Pi = PPVal(splines(3),t);
% E_O2 = PPVal(splines(4),t);
% E_SUC = PPVal(splines(5),t);
% E_GLC = PPVal(splines(6),t);
% E_FRU = PPVal(splines(7),t);

% %
% NO3 = PPVal(splines(8),t);
% NH4 = PPVal(splines(9),t);
% Pi = PPVal(splines(10),t);
% SUC = PPVal(splines(11),t);
% GLC = PPVal(splines(12),t);
% FRU = PPVal(splines(13),t);
% G6P = PPVal(splines(14),t);
% F6P = PPVal(splines(15),t);

```



```

        Vmax(29).*G6P./(Km(29)+G6P); % R29 : STH
synthesis
        Vmax(30).*G6P./(Km(30)+G6P); % R30 : STA
synthesis
        Vmax(31).*ACOA./(Km(31)+ACOA); % R31 : LIP
synthesis
    ];

k=0;

Mx = 293.9; %gDW/mol
ratio = 10; %gFW/gDW

% BILAN MASSE
% nsplines = [nsplines; y(28:39)];
dndt = N'*r.*X;%k*(nsplines-y(1:39)); % BILAN MASSE (INTRA)

dndt(27) = r(26)*1e-6*Mx*ratio*X;

dndt(4) = 0;

dVdt = -alpha.*dndt(27); % BILAN VOLUME

dydt = [dndt;dVdt];

end

```